PSL UNIVERSITÉ PARIS

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Institut Curie

Développement d'un système de microfluidique de gouttes pour l'analyse d'échantillons complexes

Soutenue par
Mathilde RICHERD
Le 09 juillet 2021

Ecole doctorale n° 388
Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris-Centre

Spécialité
Chimie Physique

Composition du jury :

Anne, VARENNE Professeur des universités, Chimie ParisTech - PSL	*Présidente du jury*
Myriam, TAVERNA Professeur des universités, Institut Galien Université Paris-Saclay	*Rapporteuse*
Yves, FOUILLET Directeur de recherche, CEA-Leti	*Rapporteur*
Florent, MALLOGGI Chargé de recherche, CEA Saclay	*Examinateur*
Stéphanie, DESCROIX Directrice de recherche, Institut Curie	*Directrice de thèse*

institutCurie | PSL

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon jury de thèse qui a accepté de lire et évaluer mon travail. J'ai beaucoup apprécié les questions et la discussion qui ont suivi ma présentation de soutenance. Merci particulièrement aux rapporteurs Myriam Taverna et Yves Fouillet pour les rapports précis et constructifs sur mon manuscrit.

Je souhaite ensuite adresser mes remerciements à ma directrice de thèse Stéphanie Descroix pour m'avoir confiée ce sujet de thèse. Merci de m'avoir encouragée par ton enthousiasme et ton optimisme sur ces projets. Je te suis très reconnaissante d'avoir pris le temps de relire et corriger mon manuscrit. Merci pour la communication facile et la bonne ambiance que tu inspires dans l'équipe qui a été très importante pour moi.

Je remercie tous les membres de l'équipe MMBM pour ces trois années dans une ambiance familiale et stimulante scientifiquement. Je suis très fière d'avoir fait partie de cette équipe et spécialement de la droplet team ! Je suis particulièrement reconnaissante à Ismail de m'avoir tout appris en microfluidique et microfabrication en stage et un grand merci à Marco de m'avoir lancée au début de ma thèse en installant les manips avec moi et pour les réflexions sur la création des expériences. Merci beaucoup à Simon pour le travail et les expériences que nous avons faits ensemble et la communication facile. Et vous trois, Ismail, Marco et Simon, m'avez aussi appris à quel point une expérience a plus de chance de fonctionner avec de la bonne musique en fond sonore !

Je tiens notamment à remercier les collègues devenus amis qui ont partagé le bureau avec moi : Elodie pour tous les goûters partagés, Terence pour l'atout décoration, Simon, Audric, Aurélien, Vivian et les autres ! Je n'oublie pas les fidèles de la cantine : Giacomo, Moencopi, Monica, Emile et al. Enfin merci aux « anciens » qui m'ont accueillie et transmis l'esprit de l'équipe : Lucile, Lauriane, Charles, Ismail et Marco et merci aussi à Manh pour les nombreuses discussions autour d'un thé.

Je remercie vivement la plateforme BMBC de l'Institut Curie pour les formations et conseils en biologie : Fanny qui nous a formé sur la culture cellulaire, Aude qui a pris du temps pour nous expliquer la qPCR, Fahima pour les discussions et John pour la réalisation de l'essai Bradford. Merci à tous pour votre disponibilité et votre pédagogie.

Je souhaite ensuite remercier les collaborateurs avec qui nous avons mené le projet de couplage MALDI/microfluidique de goutte. Merci à Florent Malloggi et Sarah Bregant du CEA de Saclay avec qui le projet a été initié et à Joëlle Vinh et Emmanuelle Demey de l'ESPCI qui nous ont rejoint. Je tiens particulièrement à remercier Emmanuelle qui a répondu à toutes mes questions sur la spectrométrie de masse et pour sa bonne humeur communicative qui a rendu les après-midis à acquérir des spectres de masses très sympathiques.

Enfin je souhaite remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenue pendant ces années de thèse. J'ai été très touchée par la présence de nombre d'entre vous à ma soutenance de thèse. Et merci à Alban pour la participation artistique à ma présentation et mon manuscrit, surtout merci de m'avoir toujours encouragée.

Table des matières

INTRODUCTION 6

CHAPITRE 1 - METHODES BIOANALYTIQUES ET MINIATURISATION 8

I. Analyses multi-omiques sur cellules uniques 8

1. Enjeux de l'analyse multi-omique de cellules uniques 8
2. Analyses des génomes et transcriptomes de cellules uniques 11
3. Analyses multi-omiques en microfluidique 16

II. Etude des génomes ou transcriptomes de cellules uniques en microfluidique de gouttes 24

1. Microfluidique de gouttes pour l'analyse de cellules uniques 24
2. Analyses génomiques de cellules uniques en microfluidique de gouttes 28
3. Analyses transcriptomiques de cellules uniques en microfluidique de gouttes 34

III. Analyses protéiques en microfluidique de gouttes 38

1. Méthodes pour l'analyse protéique en gouttes 38
2. Microfluidique de gouttes pour la spectrométrie de masse 43
3. Préparation d'échantillons sur puce 49

IV. Conclusion 55

BIBLIOGRAPHIE 56

CHAPITRE 2 - DEVELOPPEMENT D'UN SYSTEME DE MICROFLUIDIQUE DE GOUTTES POUR LA SEPARATION DES GENOMES ET TRANSCRIPTOMES DE CELLULES UNIQUES 72

I. Principe et avantages des pinces magnétiques 73

1. Utilisation de support solide en biologie analytique 73
2. Utilisation de support solide magnétique en microfluidique de gouttes 74

II. Conception de l'expérience en gouttes 82
1. Principe général 82
2. La séparation physique 83
3. Caractérisation des performances de la méthode 85
4. Autres choix expérimentaux 91

III. Résultats des expériences d'extraction spécifique d'ARNm et d'ADNg 93
1. Séparation ARN/ADN à partir d'un mélange d'ARN et d'ADN purifiés 93
2. Séparation à partir de lysat cellulaire 100
3. Séparation à partir de quelques cellules entières 108

IV. Conclusion et perspectives 113

BIBLIOGRAPHIE 115

CHAPITRE 3 - PREPARATION D'ECHANTILLONS EN GOUTTES POUR LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF 122

I. Couplage de la spectrométrie de masse MALDI-TOF et de la microfluidique de gouttes 123
1. Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF 123
2. Avantage d'un couplage avec la microfluidique de gouttes 125

II. Développement du protocole expérimental 129
1. Le processus microfluidique 129
2. Dépôt des gouttes sur la plaque et effet de concentration 135
3. Fonctionnalisation des billes 138

III. Résultats et discussion 142
1. Optimisation du protocole de digestion enzymatique en gouttes 142
2. Digestion et détection d'échantillons peu concentrés 149
3. Digestion et détection avec un temps de digestion réduit 153

IV. Conclusion et perspectives 155
1. La digestion 155
2. La cristallisation 156

BIBLIOGRAPHIE 157

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 161

Annexe 1 : Détails expérimentaux de l'essai de RT-qPCR multiplexé..... 164

Annexe 2 : Essais de qPCR et RT-qPCR utilisés pour la quantification 166

Annexe 3 : Fonctionnalisation des billes magnétiques avec la trypsine 168

Introduction

Grâce à la microfluidique, les technologies d'analyses biologiques sont de plus en plus miniaturisées pour réduire les volumes des échantillons et des réactifs utilisés, automatiser les processus et intégrer différentes étapes. Ces systèmes permettent aussi une diminution de la durée d'un essai biologique, une augmentation des débits d'analyse et une réduction des coûts. En particulier, les systèmes de microfluidique de gouttes, un domaine de la microfluidique qui permet de générer et manipuler des volumes nanolitriques à picolitriques discrets grâce à des phases non miscibles s'écoulant dans des microcanaux, ont connu de nombreux développements pour la miniaturisation d'essais bioanalytiques. La microfluidiques de gouttes a permis des avancées majeures dans plusieurs domaines, comme l'analyse de l'ADN tumoral circulant avec la PCR digitale, ou plus récemment l'analyse transcriptomique de cellules uniques à haut débit. Ces développements permettent d'adresser de nouvelles questions biologiques ou au moins d'avoir accès à un nouveau type d'information. Ma thèse s'inscrit dans le développement de ce type de systèmes miniaturisés pour les analyses bioanalytiques en utilisant en particulier les pinces magnétiques, qui permettent de transférer des particules magnétiques d'une goutte à l'autre. En effet, ces particules sont couramment utilisées comme supports solides dans des protocoles de purification de biomolécules ou de détection d'analytes. L'objectif de cette thèse est de présenter de nouvelles approches de bioanalyse basées sur la microfluidique de gouttes permettant de répondre à des besoins en biologie notamment. La technologie de pinces magnétiques que j'ai utilisée est très versatile, ce qui m'a permis de développer deux approches en parallèle : une pour l'analyse multimodale de cellules individuelles, basée sur l'extraction des acides nucléiques, et l'autre pour l'analyse protéomique. Ce manuscrit s'articule autour de trois chapitres comme suit.

Le premier chapitre décrit les enjeux actuels de l'analyse multimodale de cellules uniques, qui est un des sujets bioanalytiques qui connait le plus de développements depuis quelques années et pour lequel la microfluidique de gouttes est particulièrement adaptée et avantageuse. En particulier, je présente les systèmes déjà existants en microfluidique de gouttes pour l'analyse du génome ou transcriptome de cellules uniques, ainsi que les méthodes pour l'analyse protéique en microfluidiques de gouttes. Notamment, j'explique quels sont les systèmes qui permettent actuellement de combiner la microfluidique de goutte avec différents types de spectrométrie de

masse et quelles sont les techniques pour préparer des échantillons sur puce pour l'analyse par spectrométrie de masse.

Dans le deuxième chapitre, je présente le premier projet sur lequel j'ai travaillé pendant ma thèse qui porte sur le développement d'un système de microfluidique de gouttes pour la séparation physique des génomes et transcriptomes de cellules uniques. Notre but est de fournir de nouveaux outils basés sur la microfluidique de gouttes et l'extraction de particules magnétiques pour l'analyse multi-omique de cellules uniques. Actuellement, très peu de plateformes intégrées permettent plusieurs modes d'analyse de cellules uniques. Nous pensons que notre technologie de pince magnétique peut être très appropriée pour automatiser et réduire les volumes réactionnels de protocoles existants pour l'analyse multimodale de cellules uniques et notamment ceux basés sur la séparation physique des biomolécules. Le développement de notre protocole est présenté étape par étape avec les solutions mises en œuvre alors que la complexité de l'échantillon étudié augmente graduellement.

Le troisième chapitre est consacré au deuxième projet sur lequel j'ai travaillé pendant ma thèse concernant la préparation d'échantillons en gouttes pour la spectrométrie de masse MALDI-TOF. J'y expose l'intérêt de notre projet de couplage de spectrométrie de masse MALDI-TOF avec la microfluidique de gouttes, en présentant notamment l'effet de concentration de cristaux initialement observé par nos collaborateurs du CEA et l'intérêt de la digestion en gouttes sur billes magnétiques. Je décris ensuite le protocole expérimental mis en place, ainsi que le développement et l'optimisation de celui-ci qui présente des spécificités liées à la manipulation d'huile volatile et de solvant organique. Nous avons cherché dans un premier temps à obtenir la concentration de cristaux lors du dépôt d'échantillon avec notre système, puis nous avons optimisé les conditions de digestion en gouttes afin de caractériser les performances obtenues pour la détection et l'identification d'une protéine modèle.

Chapitre 1 - Méthodes bioanalytiques et miniaturisation

I. Analyses multi-omiques sur cellules uniques

1. Enjeux de l'analyse multi-omique de cellules uniques

a. Analyse multi-omique

Diverses molécules composant les systèmes vivants agissent de manières interdépendantes pour accomplir les fonctions d'un organisme. Elles interagissent selon le dogme central : l'ADN fournit le code pour l'ARN, qui est traduit en protéines qui remplissent les tâches biologiques [1]. L'analyse d'un seul aspect de ce système ne fournit qu'une compréhension partielle des fonctions et structures biologiques. Cependant, grâce à de nouveaux outils, il est désormais possible d'acquérir suffisamment de données de différents types moléculaires pour adresser des questions complexes. L'intérêt d'intégrer les informations des différents omiques (ou « modes », tels que le génome, épigénome, transcriptome, protéome et même interactome …) est d'accéder simultanément aux différents niveaux de l'information biologique pour arriver à une compréhension plus détaillée et systématique des principes fondamentaux des systèmes vivants.

Par exemple dans un système biologique complexe comme une tumeur cancéreuse, les altérations aux niveaux de l'ADN, l'ARN, les protéines et le métabolite construisent des réseaux couplés de molécules dysfonctionnelles. Une étude à un niveau individuel est alors insuffisante pour clarifier la pathogénèse du cancer. L'intégration de données multi-omiques joue un rôle pivot dans l'élucidation des mécanismes moléculaires de la tumorogénèse et la découverte de nouveaux biomarqueurs et cibles de traitement [2].

b. Analyse de cellules uniques

Malgré l'intérêt évident de mettre en œuvre les différents modes précédemment cités, lorsque ces analyses s'effectuent à l'échelle d'un tissu ou d'une biopsie, les informations extraites restent parcellaires et ne permettent pas de refléter l'hétérogénéité de ces échantillons cellulaires complexes. En effet, l'analyse en volume d'un tissu qui présente une hétérogénéité cellulaire fournit théoriquement un signal moyenné sur l'ensemble des cellules. Les nouvelles techniques d'analyses de cellules uniques, passées en revues dans [3], [4] et [5], donnent accès à une résolution cellulaire et permettent d'acquérir les informations sur les sous-populations cellulaires présentes dans un échantillon pour une meilleure connaissance de l'hétérogénéité cellulaire (Figure 1). Par exemple, le séquençage de l'ADN de cellules uniques a permis d'étudier l'hétérogénéité cellulaire en termes de mutation d'ADN dans une tumeur [6]. La comparaison de l'hétérogénéité génomique entre des tumeurs primaires et des tumeurs métastatiques a mené à une meilleure compréhension de la formation des métastases [7] et à la compréhension des changements génétiques dans la tumeur qui conduit à la résistance aux traitements [8]. De plus, les développements récents des méthodes pour l'étude de l'épigénome de cellules uniques commencent à permettre d'adresser des questions fondamentales d'épigénétique [9], comme la contribution des caractéristiques de la chromatine à l'évolution et l'hétérogénéité d'une tumeur [10]. Depuis la première présentation en 2009 [11], l'étude du transcriptome de cellules uniques a connu de nombreux développements technologiques [12] et de nombreux systèmes sont actuellement commercialisés [13]. Ces développements ont ouvert la voie à d'autres types d'analyses sur cellules uniques, comme le sécrétome [14] et l'analyse des lipides [15].

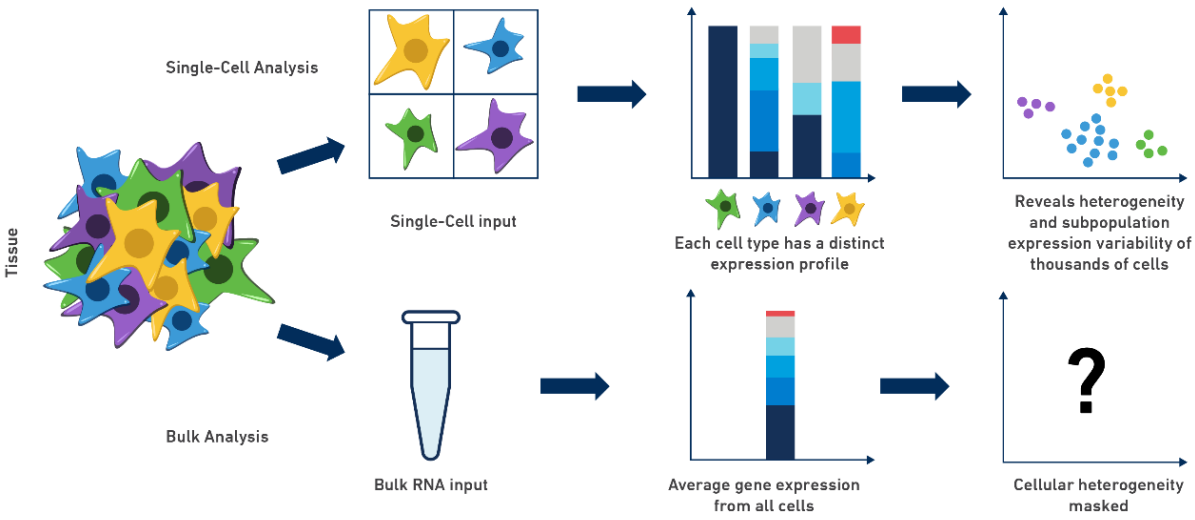


Figure 1 : Schéma illustrant l'intérêt de l'analyse de cellules uniques par rapport à l'analyse en volume. Source : https://www.biocompare.com/Bench-Tips/345311-Single-Cell-Set-Up-Sample-Preparation-Tips/

Ces avancées ont permis de découvrir l'hétérogénéité dans des échantillons qui semblaient constitués de populations uniformes de cellules [16] et dans des tissus complexes comme des tumeurs, et ces découvertes ont modifié les schémas de classification cellulaire existants. Cependant, une classification cellulaire correcte est compliquée par des difficultés associées à la caractérisation des propriétés de cellules uniques [17] [18]. En effet, la résolution de la mesure sur une unique cellule est limitée par les erreurs techniques dans le traitement de la cellule (appelé « bruit technique »), qui peuvent être dues par exemple à des erreurs dans la transcription inverse de l'ARNm, ou à une amplification non linéaire durant des cycles de PCR (Polymerase Chain Reaction). De même, l'information contenue dans la mesure sur une cellule unique peut être limitée par le « bruit intrinsèque », qui est dû au caractère dynamique de la cellule et au fait qu'elle n'a pas la même composition moléculaire à différents stades du cycle cellulaire ou au cours de la transcription d'un gène par exemple. Une stratégie pour surmonter ces limitations est d'augmenter le nombre de cellules analysées. En effet, même si une mesure cellulaire est soumise à des erreurs systématiques (bruit technique) et aléatoires (bruit intrinsèque), un débit important ainsi que la compréhension des limitations fondamentales de l'essai biologique utilisé permettent de rendre plus fiable l'étude de la distribution d'une variable dans une population. Une autre approche, qui peut être complémentaire à la première, est d'augmenter le nombre de variables mesurées sur une cellule unique. Par exemple, l'expression de plusieurs gènes qui co-varient dans la cellule peut être un meilleur indicateur que l'étude d'un seul gène. Cela est notamment rendu possible ces dernières années grâce au coût réduit et à une meilleure accessibilité du séquençage nouvelle génération (NGS) qui permet d'étudier plusieurs variables à la fois. Par exemple, l'équipe Mechta-Grigoriou à l'Institut Curie a identifié quatre sous-populations de fibroblastes associés au cancer (CAF) qui ont des rôles différents en combinant les méthodes de cytométrie, immunohistochimie et séquençage d'ARN sur cellules uniques [19].

Assurer qu'un échantillon contient seulement une cellule reste un défi technologique. La première étape est de générer une suspension de cellules uniques, qui varie considérablement entre les types de tissus et doit être optimisée pour pouvoir analyser une population de cellules viables et non biaisée [4]. Ensuite, il y a différentes approches pour isoler les cellules uniques à partir d'une suspension [20]. L'isolation manuelle est une solution adaptée lorsqu'un faible nombre de cellules doit être analysé, tout comme la microdissection laser qui permet d'étudier les cellules dans leur contexte topologique. La cytométrie de flux (FACS) est plus adaptée pour un nombre de cellules important et permet de trier des cellules phénotypiquement distinctes avec une isolation à haut débit. Les technologies microfluidiques ont aussi été largement appliquées pour l'analyse de cellules uniques, notamment grâce aux dispositifs récemment commercialisés

qui ont démocratisé leur utilisation (Fluidigm C1 [21], Drop-seq [22], InDrop [23]) et ont permis des avancées majeurs dans de nombreux domaines de la biologie comme l'étude des cellules souches [24], l'oncologie [25] ou la neurologie [26].

Une fois isolées, les cellules uniques sont lysées si l'analyte d'intérêt se trouve à l'intérieur de la cellule et différentes techniques sont utilisées pour la détection. Les acides nucléiques sont le plus souvent amplifiés avec les méthodes d'amplification de génome ou transcriptome entiers (whole genome amplification WGA, whole transcriptome amplification WTA), qui peuvent chacune apporter des erreurs techniques (décrites dans [20]). Après l'amplification, les acides nucléiques sont utilisés pour construire des librairies pour le NGS. Pour d'autres types d'analytes, comme les protéines, des méthodes telles que la détection par immunoessai fluorescent peuvent être utilisées [14]. Un grand défi de l'analyse multi-omique est d'utiliser des protocoles de détections pour les différents analytes qui soient compatibles entre eux ou d'isoler les molécules d'intérêt les unes des autres pour pouvoir les traiter séparément.

Nous nous intéresserons pour la suite particulièrement aux méthodes qui permettent d'étudier le génome et le transcriptome de cellules uniques puisque c'est une des catégories de l'analyse multi-omique de cellules uniques qui a connu le plus de développements et c'est dans cette lignée que s'inscrivent les travaux décrits dans le deuxième chapitre de cette thèse.

2. Analyses des génomes et transcriptomes de cellules uniques

a. Intérêt de l'analyse des génomes et transcriptomes

Le séquençage génomique de cellules uniques permet de révéler et de caractériser l'hétérogénéité génétique intercellulaire dans différents types de tissus, sains ou pathologiques. Mais même si les différences génétiques sont la source la plus évidente de variabilité cellulaire, le processus stochastique de l'expression des gènes peut causer une hétérogénéité à l'intérieur d'une population de cellules homogène. Pour révéler la variabilité cellulaire liée à l'expression génétique, il faut considérer aussi le séquençage du transcriptome. Un des défis actuels est de découvrir les relations de causes à effets entre les variations génomiques et les profils de transcription cellulaires. Une autre combinaison multi-omique prometteuse est de relier l'épigénétique aux variations transcriptomiques de cellules uniques, dont plusieurs méthodes sont citées dans [4].

Un avantage considérable du séquençage du génome et transcriptome d'une même cellule est que la corrélation génotype-phénotype peut être déterminée de manière non ambiguë [3] [4]. Ainsi, la variabilité génomique d'une population de cellules peut être associée à une variabilité de transcription sans être biaisée par l'hétérogénéité cellulaire, ce qui permet l'étude de potentiels mécanismes moléculaires responsables des phénotypes différents entre les cellules uniques. De plus, le séquençage simultané du génome et du transcriptome de cellules uniques peut permettre de reconstruire des arbres de lignée cellulaire. En effet, le profil génomique permet de reconstruire la lignée cellulaire (phylogénie) sur la base des mutations héritées et le profil transcriptomique de ces mêmes cellules fournit des informations sur le phénotype et les fonctions cellulaires. Enfin, le séquençage simultané du génome et du transcriptome d'une même cellule permet de détecter les mutations avec une plus grande précision, puisque les mutations trouvées sur l'ADN ou l'ARN peuvent se vérifier deux à deux. Nous donnons ensuite des exemples d'applications de l'analyse du génome et transcriptome de cellules uniques, après avoir passé en revue les principales techniques utilisées actuellement pour y parvenir. Nous ne décrivons pas ici les techniques de séquençages mais nous nous concentrons sur les étapes en amont.

b. Stratégies

Le développement des premières technologies de NGS en 2005 a ouvert la voie aux premiers séquençages du transcriptome de cellules uniques en 2009 [11] et du génome de cellule unique en 2011 [27]. Le nombre d'études de séquençage sur cellules a alors connu une augmentation considérable et elles ont impacté divers domaines de la biologie [20]. C'est en 2015 qu'apparaissent les premières analyses multi-omiques de cellules uniques.

Une première approche pour l'analyse simultanée du génome et du transcriptome de cellules uniques est celle de « DNA- and RNA- Sequencing » (DR-Seq), implémentée par Dey et al en 2015 [28]. La méthode consiste en l'isolation des cellules capturées manuellement dans des puits, leur lyse complète suivie de la transcription inverse de l'ARN messager (ARNm) pour synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) en y ajoutant un promoteur spécifique à la T7 ARN polymérase utilisé lors de la seconde étape. La première amplification se fait simultanément pour l'ADNc et l'ADN génomique (ADNg) dans la même solution, qui est ensuite séparée en deux moitiés qui sont traitées de manières différentes. Dans la première moitié l'ADNg subit une nouvelle série d'amplifications pour la préparation de librairie pour le NGS. Dans la deuxième moitié l'ADNc est transcrit grâce au promoteur spécifique à la T7 ARN polymérase (avec la technique de transcription in vitro) puis amplifié pour la préparation de librairie pour le NGS. Cette méthode ne cherche pas à séparer physiquement l'ADNg et l'ARNm initialement présents dans la cellule,

contrairement aux deux autres stratégies présentées ensuite, ce qui présente l'avantage de limiter la perte de matériel lors d'étapes de transfert avant l'amplification mais impose que l'ADNg et l'ADNc subissent le même protocole tant que la solution n'est pas séparée en deux. Grâce à cette méthode qui permet d'analyser une trentaine de cellules les auteurs ont montré que les gènes avec une grande variabilité cellulaire en nombre de transcrits ont en général un plus bas nombre de copies génomiques.

Une autre approche est celle de « Genome and Transcriptome sequencing » (G&T-seq) présentée en 2015 par Macaulay et al [29] [30]. Les cellules sont isolées dans une plaque 96 puits par FACS ou manuellement puis lysées entièrement. Dans cette méthode, l'ARNm est physiquement séparé de l'ADNg en utilisant des billes magnétiques fonctionnalisées par des oligonucléotides poly-T pour capturer et isoler du reste de la cellule lysée les molécules d'ARNm possédant une queue poly-A, complémentaires des brins poly-T portés par les billes. L'ARNm et l'ADNg peuvent être ensuite amplifiés et séquencés parallèlement, avec différentes techniques suivant la méthode de séquençage choisie pour la suite. Un des défis de la séparation physique de l'ARNm et l'ADNg est la possibilité de perdre du matériel génétique pendant la manipulation. Pour minimiser la perte d'ADNg, le même cône de pipette est utilisé pour toutes les étapes de transfert et les cônes sont lavés après le dernier transfert. Les produits de lavage sont ajoutés au lysat cellulaire contenant l'ADNg. Après le dernier lavage des billes qui ont capturé l'ARNm, l'ARNm est rétrotranscrit puis amplifié intégralement. Les auteurs notent que les séquences du transcriptome obtenu avec ce protocole sont comparables à celles générées par un protocole de séquençage de transcriptome de cellules uniques (Smart-seq2) en termes de nombre de transcrits détectés, couverture de la longueur totale des transcrits, distribution en nucléotides G et C et détection des molécules d'ARN de références. Ces similarités indiquent que des biais supplémentaires ne sont pas introduits par la séparation physique de l'ARNm du lysat cellulaire. L'ADNg contenu dans la première plaque est concentré par immobilisation réversible sur phase solide (SPRI, le fonctionnement de ces billes est décrit au chapitre 2) en le capturant sur des billes magnétiques et resuspendu dans une solution adaptée à l'amplification WGA. Le génome et le transcriptome amplifiés peuvent ensuite subir les protocoles de séquençage standards. La méthode a notamment été appliquée pour détecter les variations génomiques et leurs conséquences sur le transcriptome dans des cellules uniques. La méthode G&T-seq est celle dont nous nous sommes inspirés pour établir le protocole utilisé comme explicité dans le chapitre 2.

La troisième stratégie est celle adoptée par Hu et al en 2016 avec la méthode « single cell methylome and transcriptome sequencing » (scMT-seq) [31] et par Hou et al en 2016 avec leur méthode « single cell triple omics sequencing » (scTrio-seq) [32]. Dans cette approche, les cellules uniques sont traitées avec un tampon de lyse sélectif de la membrane, avec lequel la membrane

cellulaire est cassée tandis que le noyau reste intact. Le noyau est ensuite séparé physiquement du cytoplasme, contenant l'ARN, par micropipetage [32] ou centrifugation [31]. L'avantage est que le noyau sert d'enveloppe pour l'ADNg lors de la manipulation, ce qui réduit les risques de perte de matériel génomique. Plus récemment, Han et al ont implémenté la méthode « simultaneous isolation of genomic DNA and total RNA » (SIDR) [33]. Cette technique tire aussi partie de la compartimentalisation de l'ADN et l'ARN dans la cellule. Il y a quatre étapes (Figure 2) : premièrement les cellules dissociées sont incubées avec des microbilles magnétiques conjuguées avec des anticorps qui s'attachent sur la membrane cellulaire ; ensuite les cellules uniques marquées avec les microbilles sont triées dans une microplaque de 48 puits ; puis une lyse hypotonique (choc osmotique) est effectuée sur les cellules uniques de sorte à libérer l'ARN dans le surnageant mais pas le noyau ; et enfin le surnageant contenant l'ARN total est séparé de la cellule « vidée » de son cytoplasme mais contenant le noyau en utilisant la force magnétique pour maintenir la cellule dans le tube. Leurs résultats indiquent que la fuite d'ADNg dans le surnageant lors de la lyse cellulaire est négligeable et qu'environ 70 à 80% des molécules d'ARN sont retrouvées dans cette méthode, dépendant des types de cellules analysées. Un avantage de cette méthode est que l'ARN total peut être analysé, contrairement à RD-seq et G&T-seq qui n'analysent que l'ARNm, ce qui est très intéressant pour certaines applications comme l'oncologie par exemple puisqu'une expression dérégulée des longs ARN non codants pourrait être un marqueur clinique de plusieurs cancers [34].

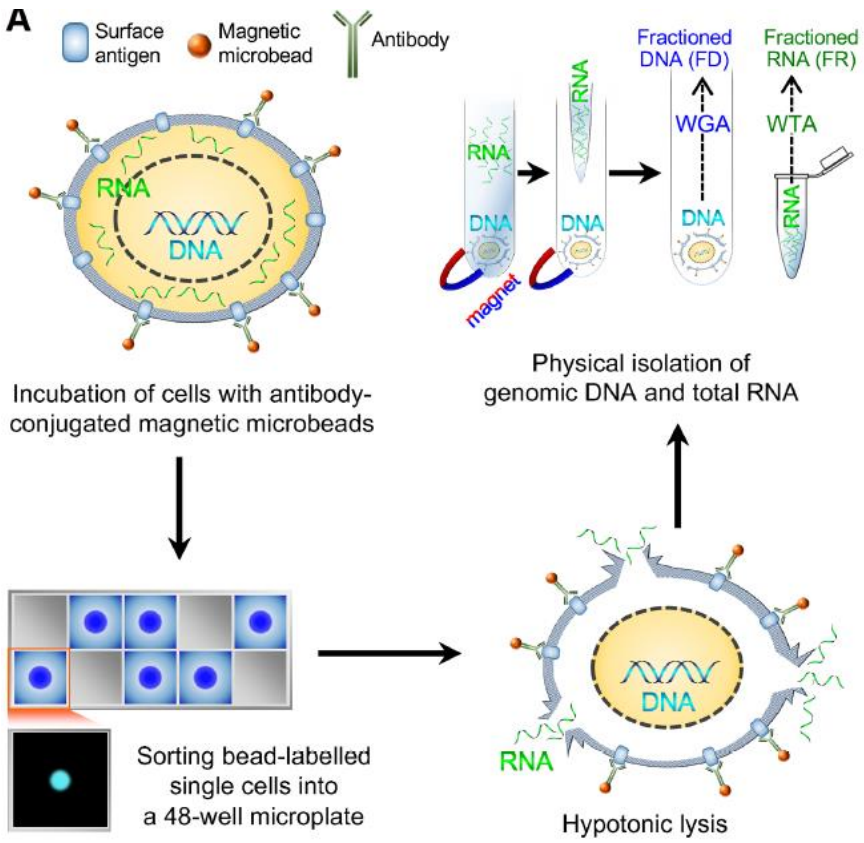


Figure 2 : Principe de la méthode SIDR. De [33].

L'avantage majeur d'éviter la séparation de l'ADN et de l'ARN présents initialement dans la cellule unique, comme dans DR-seq, est que cela minimise le risque de perte de matériel génomique ou transcriptomique de la cellule durant les étapes de transfert. De l'autre côté, l'avantage de la séparation physique, comme dans G&T-seq, scMT-seq, scTrio-seq et SIDR, est que l'ADNg et l'ARN sont susceptibles de subir des protocoles indépendants choisis pour l'amplification et le séquençage ensuite. Cependant, les protocoles qui utilisent la séparation du noyau et du cytoplasme sont souvent dépendants d'une isolation manuelle du noyau de chaque cellule, ce qui les rend compliqués à appliquer à des débits importants. Nous pouvons toutefois noter que même pour les autres protocoles qui pourraient être faits sur des plateformes de pipetage automatisées, leur mise en œuvre est complexe et les débits annoncés pour l'instant par les différentes méthodes se trouvent entre 33 et 172 cellules. Ces débits peu élevés rendent ces méthodes sensibles au bruit technique et au bruit intrinsèque, discutés dans la section précédente, mais les rendent adaptées à l'étude d'échantillons rares.

c. Quelques applications

Plusieurs méthodes pour le séquençage du génome et transcriptome de cellules uniques, dont DR-seq et G&T-seq en particulier, ont démontré comment les variations génomiques dans une population cellulaire peuvent expliquer les variations transcriptomiques. Ces deux techniques ont été appliquées pour révéler le lien direct entre le nombre de copies de chromosomes et l'expression génétique dans une cellule unique. De plus, leurs données montrent que les gènes avec un nombre faible de copies d'ADN ont tendance à générer des transcrits avec un niveau d'expression plus bruité [28]. Plus récemment, Han et al [33] ont aussi montré que la variation du nombre de copies est positivement corrélée au niveau d'expression du gène correspondant, notamment en analysant des cellules tumorales. De plus, la méthode scTrio-seq a été utilisée pour mettre en évidence des relations entre les variations du nombre de copies de gènes, leurs méthylations et leurs niveaux de transcription [32]. Ce type d'information est d'un grand intérêt pour l'étude de pathologies comme le cancer [35] [36].

Les corrélations génotype-phénotype de cellules uniques que ses méthodes mettent en lumière permettent d'étudier l'évolution de maladies, en particulier le cancer, dans lequel la diversité génomique et ses conséquences sur la transcription sont des éléments clés de l'origine et de l'évolution de la maladie. Dans cette optique, la méthode scTrio-seq a permis de détecter des sous-populations de cellules cancéreuses en se basant sur les variations du nombre de copies à grande échelle. De plus, ces méthodes pourraient être utilisées dans l'établissement de la phylogénie de l'évolution d'un cancer, ce qui est considéré comme une des principales applications du séquençage de cellules uniques [4], tout en annotant ces arbres de lignées cellulaires avec les données du transcriptome des cellules. Ces phylogénies annotées avec les informations du transcriptome pourront être utiles pour comprendre non seulement la biologie de l'hétérogénéité génomique et transcriptomique dans les cellules cancéreuses, mais aussi pour révéler l'architecture cellulaire et la morphogénèse des organes dans des organismes sains [37].

3. Analyses multi-omiques en microfluidique

a. Intérêt de la microfluidique pour les analyses biologiques

Les systèmes microfluidiques, qui exploitent les propriétés des fluides à l'échelle micrométrique, connaissent un développement rapide depuis une trentaine d'années et deviennent des éléments incontournables dans les techniques d'analyses biologiques actuelles [38]. Cela est largement dû aux avantages de la microfluidique par rapport aux méthodes à l'échelle macroscopiques, tels que la réduction du volume des échantillons et de réactifs,

l'automatisation des processus et l'intégration de différentes étapes [39], qui permettent une diminution de la durée d'un essai biologique et une réduction des coûts. De plus, les systèmes microfluidiques permettent de compartimentaliser un essai biologique dans des microréacteurs (nanopuits, valves ou gouttes), ce qui est très intéressant pour réduire les risques de contamination et augmenter le débit d'analyse. Nous décrivons dans cette section les principaux systèmes microfluidiques qui sont déjà utilisés pour faire de l'analyse multi-omique de cellules uniques.

b. Systèmes utilisant des valves

La plupart des systèmes microfluidiques utilisés actuellement pour l'analyse multi-omique de cellules uniques fonctionnent avec des valves contrôlées en pression qui permettent de compartimentaliser les solutions et de contrôler l'écoulement des fluides dans la puce. Les systèmes de valves consistent le plus souvent en une membrane en élastomère qui peut être défléchie avec une surpression pour bloquer le flux dans un microcanal (Figure 3). De cette manière, les valves peuvent être utilisées pour fermer un canal ou confiner une cellule [40]. Le principal avantage des méthodes utilisant des valves est qu'elles sont facilement contrôlables, cependant elles nécessitent une microfabrication à plusieurs niveaux et un contrôle pneumatique qui peut devenir complexe lors de l'intégration d'un grand nombre de valves. Plusieurs valves peuvent être combinées pour réaliser une série d'opérations, telles qu'ajouter, retirer ou mélanger des réactifs, et ainsi exécuter des protocoles complexes.

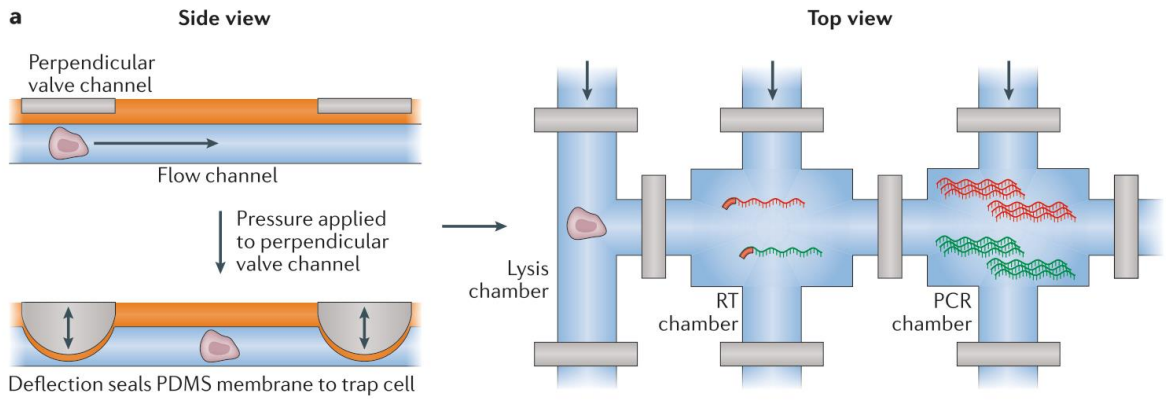


Figure 3 : Principe des valves contrôlées en pression. Deux canaux perpendiculaires sont alignés et séparés par une fine membrane, un canal pour le flux de cellules et de solution, l'autre pour le contrôle en pression. Pour isoler une chambre, une surpression est appliquée dans le canal de contrôle, défléchissant la membrane dans le canal du flux pour le bloquer, et ainsi piéger son contenu. Source : [18].

Les premiers à avoir rapporté un système microfluidique capable d'analyser simultanément le transcriptome et le génome de cellules uniques sont Han et al. en 2014 [41]. Leur technique est similaire à celles de scTrio-seq [32] puisqu'elle repose aussi sur la lyse partielle de cellule unique pour séparer le noyau contenant l'ADNg du cytoplasme contenant l'ARN. La puce en PDMS qu'ils présentent permet de capturer des cellules uniques, de faire la lyse sélective et de séparer le noyau du contenu du cytoplasme, de faire la rétrotranscription sur puce de l'ARNm pour générer l'ADNc et d'amplifier simultanément l'ADNc et l'ADNg (Figure 4). Cette puce contient 27 lignes de contrôles pour 105 valves pour l'analyse de 7 cellules en parallèle.

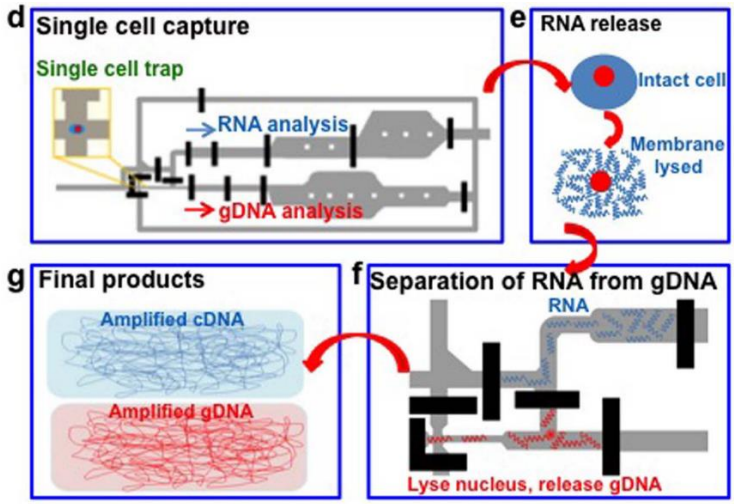


Figure 4 : Design de la puce et processus pour la séparation et l'amplification de l'ARNm et l'ADNg à partir d'une cellule unique Les canaux mesurent entre 30 et 800 µm de large et 20µm de haut. Source : [41].

Cette publication a montré pour la première fois l'utilisation d'une puce microfluidique pour la co-détection et amplification du génome et du transcriptome de cellule unique. Les auteurs rapportent plusieurs pistes d'amélioration, notamment sur l'efficacité de la rétrotranscription, qui pourrait être améliorée avec un meilleur mélange des réactifs, et le choix du matériau qui peut adsorber les acides nucléiques. De plus, les puces peuvent analyser au maximum sept cellules uniques, ce qui ne permet pas en l'état d'établir une corrélation entre le génome et le transcriptome des cellules uniques.

Les deux autres techniques présentées ensuite permettent d'analyser le transcriptome et le protéome de cellules uniques.

Fluidigm, un des principaux fabricants de systèmes microfluidiques, a mis en vente en 2014 le système C1 AutoPrep, qui contrôle un circuit fluidique intégré capable de capturer

automatiquement des cellules uniques et de traiter jusqu'à 96 cellules en parallèle pour séquencer leur génome ou transcriptome [21]. Cette plateforme a été utilisée dans un grand nombre de publications (>200) avec diverses applications (recensées sur www.fluidigm.com/publications/c1) : immunologie, oncologie, dépistage de biomarqueurs, etc. , mais seulement quelques-unes rapportent des analyses multi-omiques de cellules uniques avec la mesure du protéome et du transcriptome de cellules uniques [42] [43] [44]. Le principe est similaire dans ces trois publications : premièrement les cellules individuelles sont isolées sur les 96 sites de capture de la puce C1. Ces cellules sont lysées avec une solution tampon contenant des amorces et des anticorps marqués avec des brins d'ADN complémentaires, puis incubées pour que les anticorps s'attachent à leurs protéines cibles. Ensuite la réaction de polymérisation de l'ADN est réalisée en utilisant une reverse transcriptase pour simultanément prolonger les brins complémentaires qui se trouvent sur les anticorps et rétrotranscrire l'ARN en ADNc en utilisant les amorces. Finalement, les séquences d'ARN ainsi que les protéines ciblées donnent des brins d'ADN amplifiables par PCR. Cette méthode a été appliquée pour évaluer les effets d'un agent thérapeutique expérimental sur des cultures cellulaires de glioblastome (cancer cérébrale le plus fréquent chez l'adulte) [42], observer la réponse d'une lignée cellulaire d'adénocarcinome (type de cancer qui se développe à partir de cellules de glandes mammaires) à différents environnements biochimiques [43] et révéler différents aspect de la relations protéines/ARNm en séparant des sous-populations cellulaires [44]. Cependant, des utilisateurs de cette puce ont rapporté qu'il est souvent difficile de distinguer si une ou deux cellules ont été piégées dans les chambres, ce qui peut conduire à des erreurs dans l'analyse. On peut noter que cette méthode, comme la méthode DR-seq présentée dans la partie précédente, ne permet pas de séparer physiquement les molécules analysées à partir de la cellule unique.

En 2018, Xu et al ont publié leur méthode « single cell barcode chip » (SCBC) pour mesurer simultanément le transcrit et des protéines intracellulaires de cellules uniques [45]. Dans cette approche, les cellules uniques sont isolées dans des chambres individuelles et entièrement lysées comme sur la puce C1 de Fluidigm. Plusieurs protéines ciblées sont alors capturées spécifiquement par un quadrillage d'anticorps et détectées en effectuant un immunoessai sandwich fluorescent. Pour le transcriptome, des billes greffées sont ajoutées. Elles sont fonctionnalisées avec une séquence de nucléotides spécifique à chaque bille et une queue poly-T pour capturer les queues poly-A des ARNm. Cette technique est analogue à la méthode des codes-barres utilisée en microfluidique de goutte, décrite dans la partie suivante. Ces billes servent aussi à capturer de petits oligomères d'ADN spécifiques à chaque compartiment qui permettent de coder la position spatiale de la microchambre avec ses positions X et Y. Ensuite les billes sont rassemblées pour le séquençage et la localisation, codée par les oligomères d'ADN, de chaque transcriptome peut être retrouvée pour l'associer à la lecture en fluorescence du protéome (

Figure 5). Ici, les molécules analysées sont séparées grâce à l'interaction spécifique des protéines cellulaire avec les anticorps, qui permet de faire un immunoessai dans la puce, et à la capture de l'ARN par les billes, qui permet de rétrotranscrire et amplifier l'ARN quand les billes sont lavées hors de la puce.

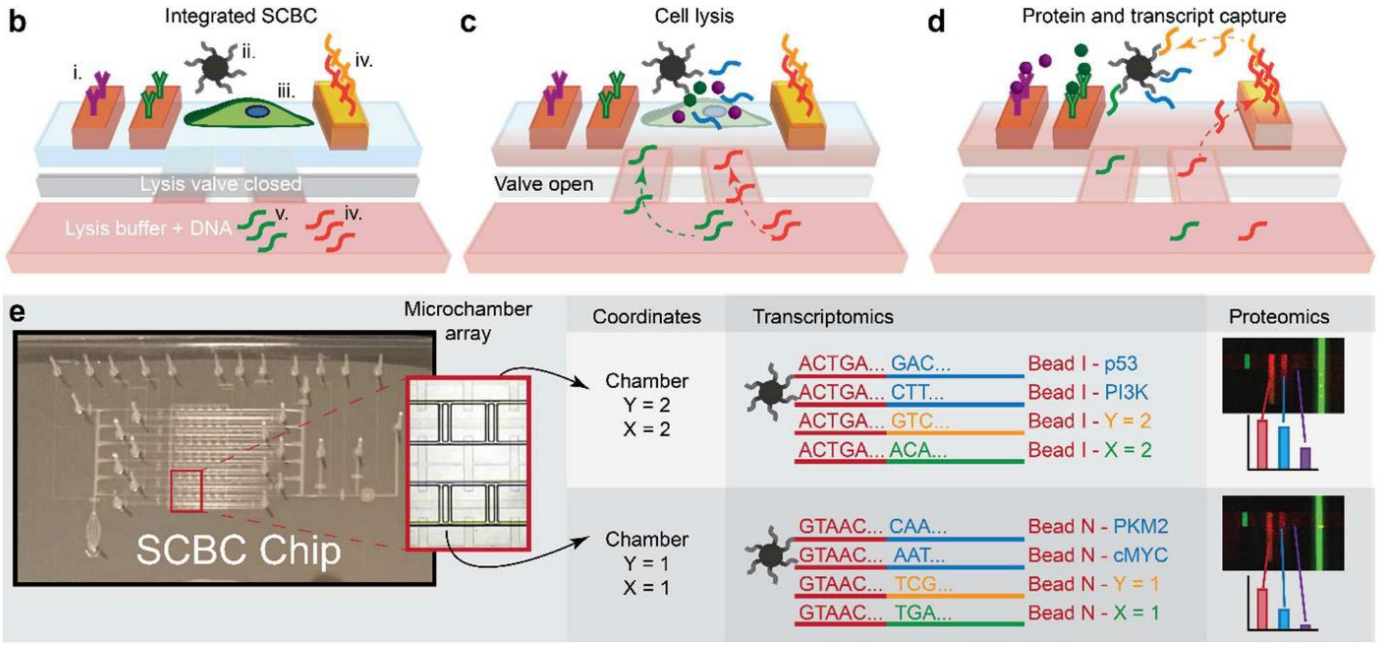


Figure 5 : Principe de la méthode pour mesurer simultanément le transcrit et des protéines de cellules uniques. b. Chaque microchambre contient (i.) un quadrillage d'anticorps, (ii.) des billes de séquençage, (iii.) une cellule, (iv.) la coordonnée X en ADN simple brin liée à la chambre, (v.) la coordonnée Y en ADN simple brin, et (vi.) les oligonucléotides de déplacement (qui servent à substituer la coordonnée X). c. Le contenu de la cellule est relargué dans la microchambre et les oligomères de localisations sont introduits en ouvrant la valve de lyse. d. Après incubation, les protéines sont capturées par les anticorps, et les brin d'ARN et les oligomères de localisation sont capturés sur les billes. e. Dans ces puces de 6x6, les microchambres sont identifiées par leurs coordonnées spatiales sur la puce, et les résultats du séquençage sont triés par leur séquence d'identifiant de billes (en rouge). Ces résultats consistent en : les gènes (bleu), la coordonnée Y (en jaune) et la coordonnée X (en vert). Une carte spatiale des transcriptomes est générée et reliée aux mesures de protéomes de chaque chambre. Source : [45].

Les mesures effectuées grâce à cette méthode n'ont pas montré de corrélation entre la mesure de 3 protéines et leurs transcrits pour des cellules uniques mais correspondent aux tendances de l'analyse en masse. Cela est probablement dû au faible nombre de cellules (36 maximum) que cette puce permet d'analyser. Pour augmenter le débit de leur système et propager leur méthode, les auteurs envisagent de simplifier le processus.

Finalement, malgré leur efficacité et la possibilité d'implémenter des protocoles complexes, les systèmes à valves contrôlées en pression sont chers et assez compliqués à fabriquer. C'est pourquoi ces dernières années la microfluidique multiphasique est apparue comme une alternative pour la compartimentalisation à l'échelle micrométrique.

c. Système utilisant des billes magnétiques

Le système présenté dans cette partie est celui publié en 2013 par Strotman et al. : « Selective Nucleic Acid Removal via Exclusion » (SNARE) [46]. Cette approche ne s'applique pas à l'analyse de multiples cellules uniques en parallèle mais est intéressante dans le cadre de cette thèse car elle permet d'extraire l'ADN et l'ARNm d'un échantillon d'un faible nombre de cellules (<10) en utilisant deux types de billes magnétiques et en tirant partie d'un système biphasique. Ce système est particulier car il n'utilise pas les techniques de compartimentalisation classique en microfluidique pour les applications bioanalytiques que sont les valves, les nanopuits et les gouttes, mais a une géométrie propre qui exploite la dominance de la tension de surface sur la gravité à l'échelle micrométrique pour créer des murs entre deux phases immiscibles (Figure 6). Cette méthode utilise la technique de filtration immiscible assistée par la tension de surface, implémentée dans la même équipe [47], qui se base sur le fait qu'une phase aqueuse et de l'huile peuvent être insérées côte à côte pour former des « murs virtuels ». Premièrement, des particules paramagnétiques (PMPs) fonctionnalisées avec des brins poly-T et un tampon de lyse et de liaison, optimisé pour capturer les ARNm, sont ajoutés dans le puit d'entrée contenant les cellules. Après la capture des ARNm par les particules, un aimant externe est utilisé pour conduire ces particules, et donc l'ARNm, à travers le puit du milieu contenant l'huile jusqu'au puit de sortie à l'avant. Ensuite, des particules paramagnétiques couvertes de silice sont ajoutées au puit d'entrée dans un tampon de lyse et de liaison optimisé pour capturer l'ADN. Une fois que l'ADN est capturé, les particules sont déplacées avec le même aimant que précédemment à travers le puit du milieu jusqu'au puit de sortie arrière. Les échantillons peuvent ensuite être récupérés pour les analyser séparément.

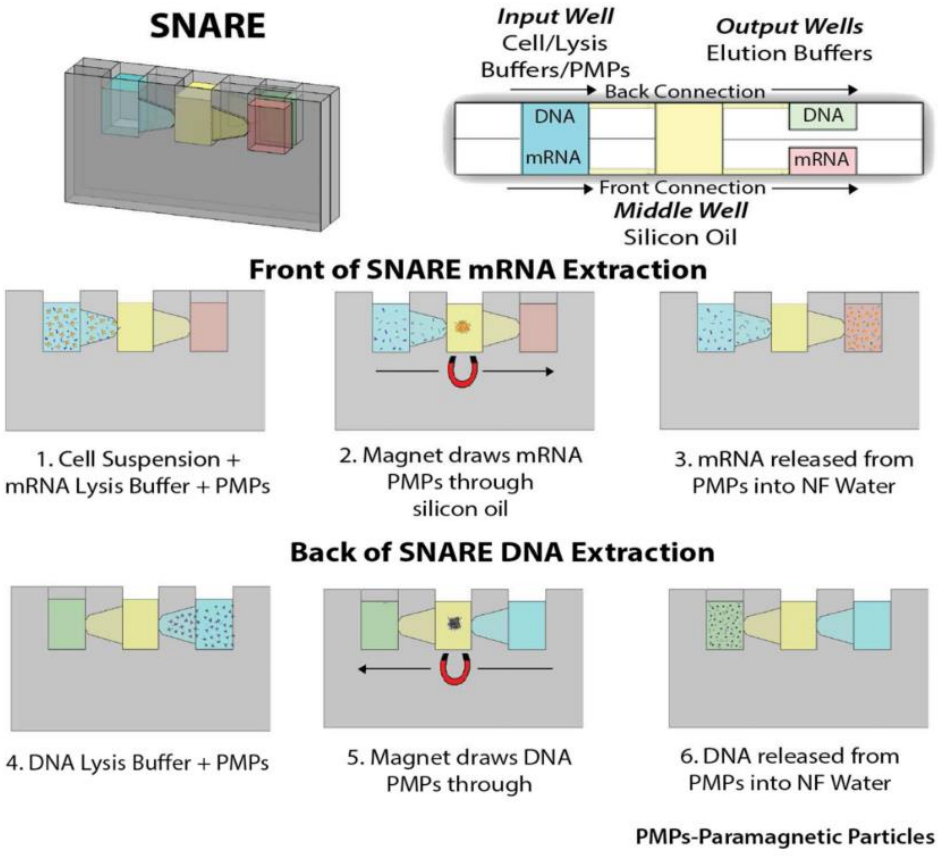


Figure 6 : Design du système SNARE et principe de la méthode. [46]

L'utilité de cette méthode pour isoler l'ARNm et l'ADN de populations de cellules rares a été montrée en utilisant des cellules tumorales circulantes (CTCs) comme modèle. L'avantage principal de cette méthode relevé par les auteurs est qu'elle nécessite moins de temps, de travail, de ressources et d'équipement de laboratoire que les autres méthodes utilisées en 2013 et qu'elle peut être automatisée pour un débit plus important et un traitement robotisé. Cependant elle ne permet pas l'étude de multiples cellules uniques en parallèle.

Nous avons décrit dans cette première partie les intérêts et les enjeux actuels de l'analyse multi-omique de cellules uniques. Nous nous sommes en particulier intéressé à trois types d'approches permettant d'analyser le génome et le transcriptome de cellules uniques. Nous avons vu les avantages que peut offrir la microfluidique pour ce type d'analyses et avons passé en revue les méthodes qui permettent actuellement de faire des analyses multi-omiques sur cellules uniques (ou faible nombre de cellules dans le cas de SNARE) grâce à un système microfluidique. Ces méthodes sont encore peu nombreuses, utilisent le plus souvent des systèmes complexes de valves contrôlées en pression, et encore plus rares sont celles qui s'intéressent au génome et au transcriptome simultanément. Dans la partie suivante, nous nous concentrons sur les avantages de la microfluidique de gouttes pour l'analyse de cellules uniques et nous passons en revue les systèmes utilisés actuellement pour analyser le génome ou le transcriptome de cellules uniques grâce à la microfluidique de gouttes.

II. Etude des génomes ou transcriptomes de cellules uniques en microfluidique de gouttes

1. Microfluidique de gouttes pour l'analyse de cellules uniques

a. Introduction à la microfluidique de gouttes

La microfluidique de gouttes est un domaine de la microfluidique qui permet de générer et manipuler des volumes nanolitriques à picolitriques discrets grâce à des phases non miscibles s'écoulant dans des microcanaux. En général la phase continue est de l'huile et la phase discrète est une solution aqueuse. La microfluidique de gouttes garde les avantages des systèmes microfluidiques, tels que les faibles volumes d'échantillons, l'intégration facilitée de différentes fonctionnalités et un bon contrôle des transferts de masse et de chaleurs, tout en surmontant les problèmes liés à la dispersion de Taylor (augmentation de la diffusion due au profil de Poiseuille dans les microcanaux), et la complexité du mélange qui affectent les systèmes microfluidiques en flux continu (ou en phase unique) [48]. De plus, la microfluidique de gouttes offre de nouvelles possibilités, telles que la mise en place d'essai biologique sur des très petits volumes, une contamination croisée et adsorption non-spécifique d'échantillons négligeables, et l'augmentation du mélange grâce à la convection chaotique [49]. Cependant, de nouveaux problèmes de dynamique des fluides apparaissent avec l'introduction de gouttes dans les microcanaux, notamment dus au caractère déformable de l'interface des gouttes. Il devient nécessaire de prendre en compte la tension de surface et ses variations [50]. La compréhension des éléments physiques qui entrent en jeu dans la microfluidique de gouttes a permis le développement de la technologie [51], notamment l'établissement des composants fonctionnels qui permettent de faire des opérations telles que la génération de gouttes [52] [53], leur coalescence [54] [55], leur séparation [56] ou leur tri [57]. Nous décrivons ensuite quelques aspects de la physique des gouttes qui sont particulièrement pertinents pour le travail effectué pendant cette thèse.

i. La tension de surface

Tout d'abord, la principale modification que les gouttes apportent à un flux microfluidique en phase continue est l'introduction de la tension de surface γ. Cette grandeur physique peut être vue comme une force par unité de longueur (N m^{-1}) qui tire sur l'interface. En conséquence, tout déséquilibre spatial de la valeur de γ provoque un flux le long de l'interface depuis les régions à faible tension de surface vers les régions à haute tension de surface, phénomène connu sous le nom d'effet Marangoni. Ce type de système peut être décrit par le nombre capillaire $Ca = \mu U/\gamma$, adimensionnel, qui compare la viscosité μ avec la tension de surface, U étant la vitesse caractéristique de l'écoulement. En effet, la viscosité et la tension de surfaces sont les éléments dominants en microfluidique de goutte, l'inertie étant négligeable. La valeur de la tension de surface dépend fortement de la présence locale à l'interface de molécules tensioactives. Ces molécules amphiphiles sont en général ajoutées aux systèmes de microfluidique de gouttes pour faciliter la création de gouttes et les stabiliser. Ces molécules peuvent être transportées par advection (flux hydrodynamique) ou par diffusion moléculaire, que ce soit en volume ou sur l'interface [58] [59]. Les expériences de physique modèles, telle que la méthode de la goutte pendante pour mesurer la tension de surface, peuvent aider à la compréhension physique de l'impact des tensioactifs utilisés en microfluidique de gouttes. Cependant les expériences dynamiques impliquent souvent des interactions complexes entre différents phénomènes qui ne peuvent pas toujours être compris intuitivement [50].

ii. Le transport des gouttes

Le mouvement des gouttes dans des microcanaux dépend fortement de la géométrie du système. Nous nous intéressons ici au cas où les gouttes sont très confinées dans un capillaire de forme circulaire qui leur impose une forme allongée, appelée « plug ». Une autre géométrie très courante en microfluidique de goutte est celle où les canaux sont de section rectangulaire ce qui provoque l'apparition de « gouttières » au niveau des angles et qui modifie la vitesse des gouttes par rapport à une section circulaire [50]. Il est important de noter que même dans le cas où les gouttes sont confinées dans un tube à section circulaire, celles-ci ne sont jamais en contact avec le capillaire grâce à un film de lubrification de la phase continue. Une conséquence de l'existence de ce film de lubrification est que les gouttes vont plus vite que la vitesse moyenne de la phase continue dans un tube à section circulaire, et la différence relative de leurs vitesses est proportionnelle au nombre capillaire à la puissance 2/3 [50]. Ainsi, la vitesse des gouttes confinées dépend directement de leurs viscosités : plus la goutte est visqueuse, plus sa vitesse est

élevée, et de leurs tensions de surface : plus la tension de surface de la goutte est faible, plus sa vitesse est élevée.

Un autre aspect important du transport des gouttes est le flux induit à l'intérieur des gouttes. Cette recirculation est due à la perturbation par les gouttes du profil de Poiseuille de vitesse dans la phase continue. En fait, les gouttes se déplacent à une vitesse inférieure à la vitesse maximale du flux extérieur, ce qui fait que les particules de fluide de la phase continue qui ont une vitesse supérieure à celle de la goutte (au centre du capillaire) doivent changer de direction quand elles la rattrapent [50]. Dans le référentiel de la goutte, cela s'apparente à des zones de recirculation et de stagnation (Figure 7). Le même raisonnement s'applique à l'intérieur de la goutte qui présente le même type de recirculations, qui dépendent fortement, et de manière complexe, de la viscosité de la goutte [60].

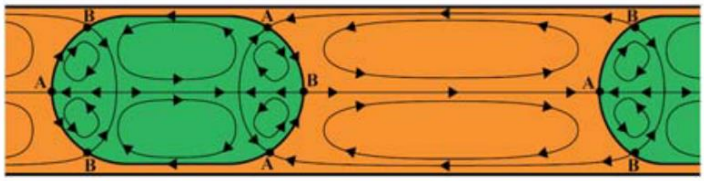


Figure 7 : Topologie des recirculations induites par la présence d'interfaces dans le cas de gouttes non visqueuses. Les points A sont les points de convergence et les points B les points de divergences. De [50], adapté de [60].

Ces recirculations présentent un grand avantage pour le mélange de solution à l'intérieur des gouttes. Pour les points de stagnations où le mélange peut être inefficace, il suffit de perturber le flux de la phase continue pour modifier la topologie des recirculations et donc la position des points de stagnation [49].

iii. La fusion de deux gouttes

La coalescence de deux gouttes est souvent nécessaire dans un protocole d'essai biochimique afin d'ajouter un réactif à l'échantillon. De nombreuses techniques ont été développées pour mettre les gouttes en contact et les faire fusionner. Elles peuvent être divisées en deux groupes : actives et passives. La coalescence active est généralement utilisée quand les gouttes sont stabilisées par des tensioactifs qui empêchent les gouttes de fusionner par gêne stérique. Dans ce cas la fusion peut avoir lieu par l'apport d'une perturbation externe, tel qu'un champ électrique [54], une onde acoustique [61] ou une augmentation locale de la température [62]. Dans le cas de la coalescence passive, il suffit de mettre les gouttes en contact pour qu'elles

fusionnent car les tensioactifs utilisés n'empêchent pas la coalescence. Diverses stratégies ont été adoptées pour mettre les gouttes en contact, comme une géométrie à base de piliers pour ralentir la première goutte [55]. L'approche utilisée dans cette thèse est celle présentée par Ferraro et al. [63], qui tire parti du fait que des gouttes qui n'ont pas la même tension de surface ou viscosité ont des vitesses différentes à cause du film de lubrification et donc peuvent être approchées l'une de l'autre. Par exemple, si un train de goutte est composé de deux gouttes de tension de surface différentes, celle qui a une tension de surface plus faible a une vitesse plus élevée, donc elle peut rattraper la première goutte pour fusionner si elle est initialement placée derrière (Figure 8). Cette méthode est pertinente pour des essais biologiques en gouttes puisque la plupart des réactifs biologiques commercialisés, comme les mélanges PCR, les milieux de culture cellulaire ou les tampons protéiques, contiennent des tensioactifs qui diminuent la tension de surface. De plus, avec cette technique, la coalescence est réalisée avec un équipement standard dans des capillaires et ne requiert pas de microfabrication.

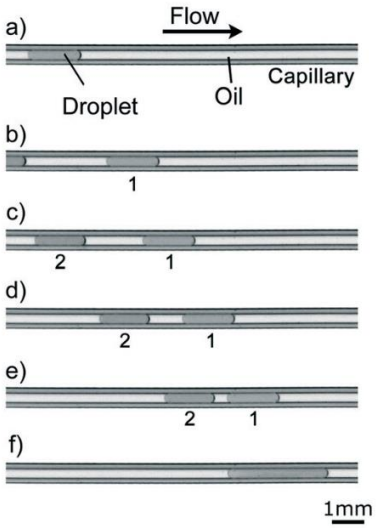


Figure 8 : Séquence d'images montrant deux gouttes de 130nL circulant dans un capillaire. La goutte 1 contient de l'eau pure et la goutte 2 contient une solution à 1% de Tween20, un tensioactif qui diminue la tension de surface. Elles sont initialement séparées de 2.5mm puis deviennent progressivement plus proches jusqu'à la coalescence. Source [63].

Finalement, la microfluidique de gouttes a fait l'objet de nombreuses applications, en analyses biochimiques ou dans le domaine de la génération de matériau, dont plusieurs sont décrites dans la revue de 2017 de Shang et al. [64]. Nous nous focalisons ici sur les applications de la microfluidique de gouttes pour l'analyse de cellules uniques.

b. Pourquoi utiliser la microfluidique de gouttes pour analyser des cellules uniques

La microfluidique de gouttes est particulièrement adaptée à l'analyse de cellules uniques, ce qui en fait une de ses principales applications [48]. Tout d'abord, le fait que les gouttes produites soient de l'ordre de grandeur en taille des cellules eucaryotes signifie qu'elles peuvent être utilisées pour contenir, manipuler et trier ces cellules de manière rapide, parallèle et à grande échelle [65]. De plus, la compartimentalisation ainsi que la présence du film de lubrification assurent que chaque goutte peut être considérée comme un bioréacteur isolé avec un risque de contamination réduit. Pour cela, les huiles fluorées sont le plus souvent utilisées puisqu'elles présentent l'avantage d'être à la fois hydrophobes et lipophobes donc elles ont une faible solubilité pour les réactifs biologiques présents dans la phase aqueuse, ce qui permet d'empêcher la diffusion moléculaire entre les gouttes. De plus, l'utilisation de tensioactif biocompatible assure que les biomolécules ne s'adsorbent pas à la surface des gouttes [66].

Nous détaillons ensuite les principales techniques de microfluidique de gouttes qui permettent de faire des analyses transcriptomiques ou génomiques sur des cellules uniques.

2. Analyses génomiques de cellules uniques en microfluidique de gouttes

Nous présentons, dans cette partie, les principales approches pour l'analyse génomique de cellules uniques en microfluidique de gouttes. Une étape critique de l'analyse du génome de cellules uniques est l'amplification de quantité d'ADN très faible (picogrammes). Trois stratégies peuvent être distinguées : l'amplification de molécules uniques en gouttes, l'amplification de parties ciblées du génome de cellules uniques et l'amplification du génome entier de cellules uniques.

a. Encapsulation et amplification de molécules uniques

Les deux approches présentées permettent de résoudre des problèmes liés à l'amplification et au séquençage de l'ADN. Un point commun de ces deux méthodes est qu'elles n'encapsulent pas une cellule entière par goutte mais une molécule unique d'ADN.

La première technique, présentée par Fu et al. en 2015 [67], concerne l'amplification de génome entier (Whole Genome Amplification, WGA). Cette méthode est nécessaire pour générer suffisamment de copies de l'ADNg pour préparer des librairies pour le séquençage de nouvelle génération (NGS). Dans le cas de détection de variation du nombre de copies, il est crucial que l'amplification du génome entier soit uniforme pour éviter l'apparition de faux positifs ou négatifs. Le fait d'encapsuler une molécule unique d'ADN et d'effectuer l'amplification en goutte permet de saturer l'amplification tout en empêchant qu'une séquence domine le processus (Figure 9). Cette technique permet d'améliorer l'uniformité de l'amplification par rapport aux méthodes en tubes et de détecter des variations du nombre de copies ou des variations de nucléotides uniques avec une plus grande fiabilité.

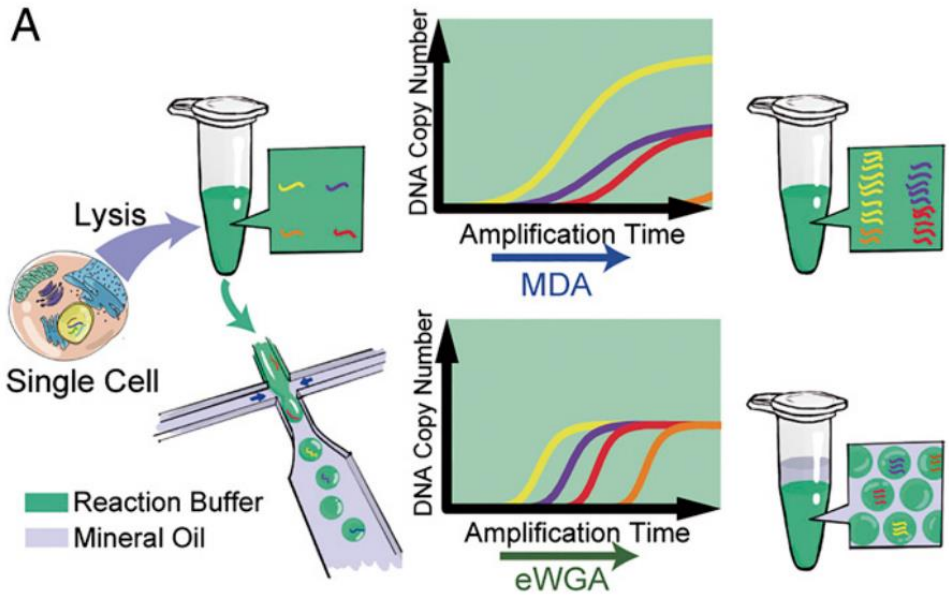


Figure 9 : Schéma comparatif d'un protocole d'amplification en tube en haut (Multiple Displacements Amplification, MDA) et du protocole en goutte (emulsion Whole Genome Amplification, eWGA) en bas. Le protocole en goutte permet d'avoir une amplification homogène sur chaque brin d'ADN alors que le protocole en tube peut présenter brins plus amplifiés que d'autres. Source : [67].

Lan et al. présentent en 2016 une méthode qui amplifie aussi des molécules uniques d'ADN en gouttes [68]. Leur but est de fournir des fragments d'amplicons pour le séquençage et de reconstituer ensuite l'intégralité des séquences d'ADN présentes initialement. Pour cela, une fois que l'ADN est amplifié, les gouttes sont fusionnées par paires avec d'autres gouttes qui contiennent l'enzyme transposase qui fragmente l'ADN tout en ajoutant des séquences adaptatrices sur les brins segmentés. Ces adaptateurs servent de sites d'accroche pour des séquences codes-barres qui sont ajoutées en goutte avec les réactifs nécessaires pour une deuxième amplification. Ces séquences codes-barres sont uniques pour chaque goutte, ce qui permet, après séquençage, de reconstituer le contenu de chaque goutte, donc les molécules d'ADN

uniques (Figure 10). Cette méthode permet de détecter plus de mutations rares que les techniques conventionnelles et génère directement les haplotypes (ensembles d'allèles situés sur un même gène et transmis ensemble), ce qui est important pour caractériser les mutations.

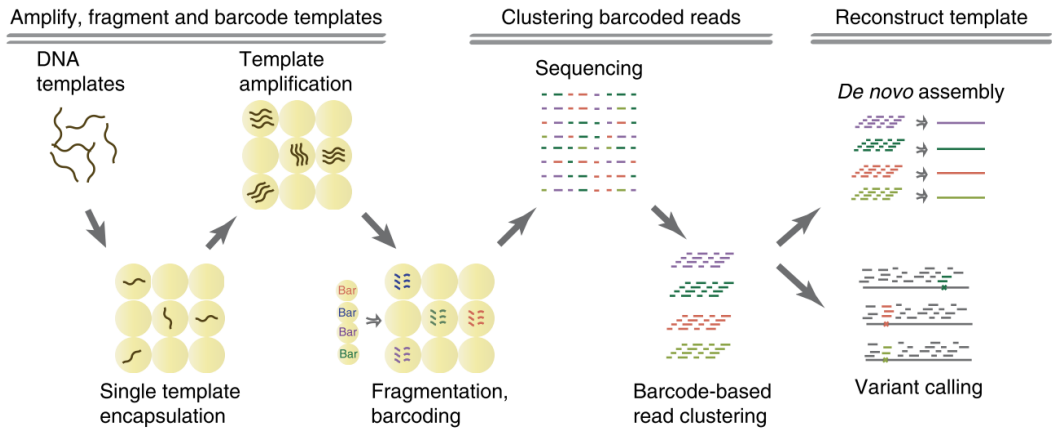


Figure 10 : Schéma du principe de la méthode d'attribution de code-barres à des molécules uniques en gouttes. Source : [68].

Les futures améliorations sur ce type de système viseront probablement à augmenter le débit de matériel analysé. En effet, les brins d'ADN ainsi que les codes-barres sont très dilués pour assurer que les gouttes contiennent des molécules uniques, ce qui implique la génération et le traitement de nombreuses gouttes vides. Malgré cela, le débit de ce système permet d'associer un code barre à environ 3500 molécules en 15 minutes, ce qui permet de couvrir 5 fois le génome d'une bactérie comme *E. coli*.

b. Amplification de séquences ciblées du génome

L'amplification de séquences ciblées du génome utilise une réaction de PCR standard. Des amorces s'attachent seulement aux séquences spécifiques qui encadrent la séquence d'intérêt qui est amplifiée à l'étape suivante. Trois technologies de microfluidique de gouttes permettent de faire cela.

L'amplification de copie génétique unique (single copy genetic amplification, SCGA) [69] repose sur la génération de gouttes nanolitriques uniformes pour effectuer une PCR sur billes. Les cellules uniques sont co-encapsulées dans des gouttes avec une billes d'agarose marqué de manière covalente avec les amorces anti-sens et le mélange PCR qui contient les amorces sens marqués avec un fluorophore et les enzymes (Figure 11 A). Ensuite les gouttes sont collectées hors de la puce, les cellules sont lysées et l'émulsion subit une série de cycles thermiques PCR qui

génère des produits double brins fluorescents à la surface des billes (Figure 11 B). Après la PCR l'émulsion est cassée et la détection de l'ADN ciblé est effectuée en mesurant la fluorescence des billes uniques par cytométrie de flux. SCGA est une méthode de détection rapide et peu couteuse. Un inconvénient de SCGA est la faible fréquence de génération des gouttes (moins de 6 Hz). Pour pallier ce problème, Zheng et al [70] ont créé un générateur d'émulsion (microfabricated emulsion generator array, MEGA) pour la génération de gouttes à haute fréquence (940 Hz). Un deuxième inconvénient est que l'efficacité de la PCR en goutte est de seulement 40% par rapport à la PCR en tube avec des concentrations équivalentes en billes, amorces et enzymes. De plus, l'encapsulation des cellules et billes suit la statistique de Poisson avec seulement une goutte sur cent qui contient à la fois une bille unique et une cellule unique.

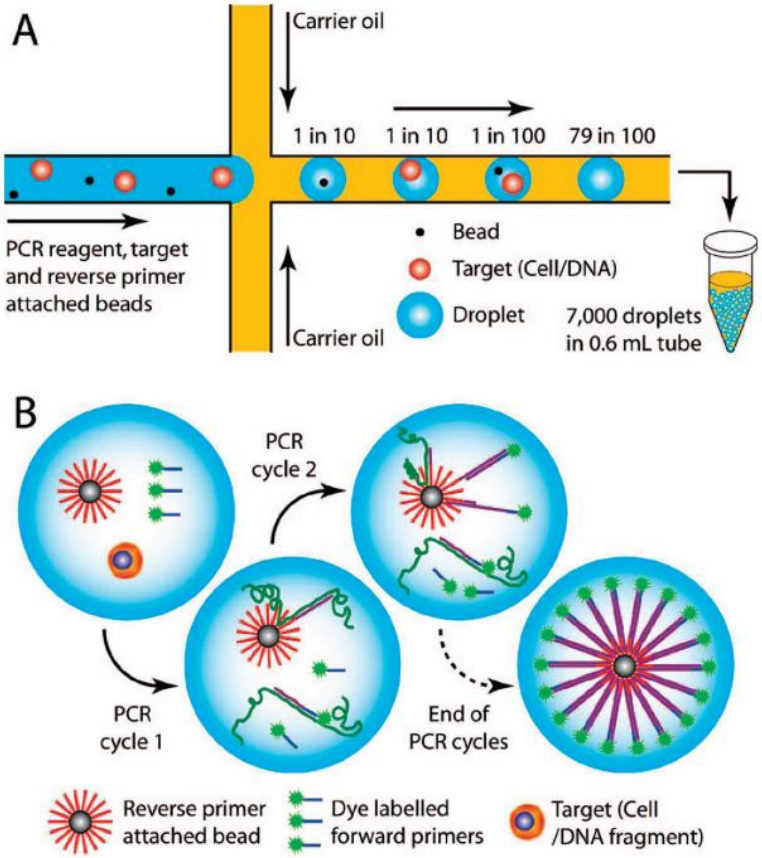


Figure 11 : Principe de la méthode SCGA. Source : [69].

Zhu et al ont développé la PCR dans des gouttes d'agarose [71]. Des gouttes sont formées à partir d'une solution d'agarose contenant une cellule unique et le mélange PCR (Figure 12). Comme SCGA, le mélange PCR contient les amorces sens fluorescentes et les enzymes. Cependant, dans ce cas, les amorces anti-sens sont attachées à l'agarose plutôt que sur les billes. Les gouttes sont collectées pour subir les cycles de PCR pour amplifier la séquence d'intérêt et ensuite les

gouttes d'agarose sont solidifiées en des billes avec les amplicons de PCR fluorescents attachés de manière covalente à la matrice d'agarose. Finalement les billes sont lavées pour enlever les fluorophores en excès qui n'ont pas été utilisés lors de la PCR et sont analysées par microscopie à fluorescence ou cytométrie de flux. Le principal avantage de cette méthode par rapport à SCGA est que la co-encapsulation des cellules et des amorces est plus efficace d'un autre de grandeur puisque les amorces sont présentes dans toutes les gouttes. Cela permet de caractériser des populations entières de cellules et de réduire la durée et le coût de l'expérience.

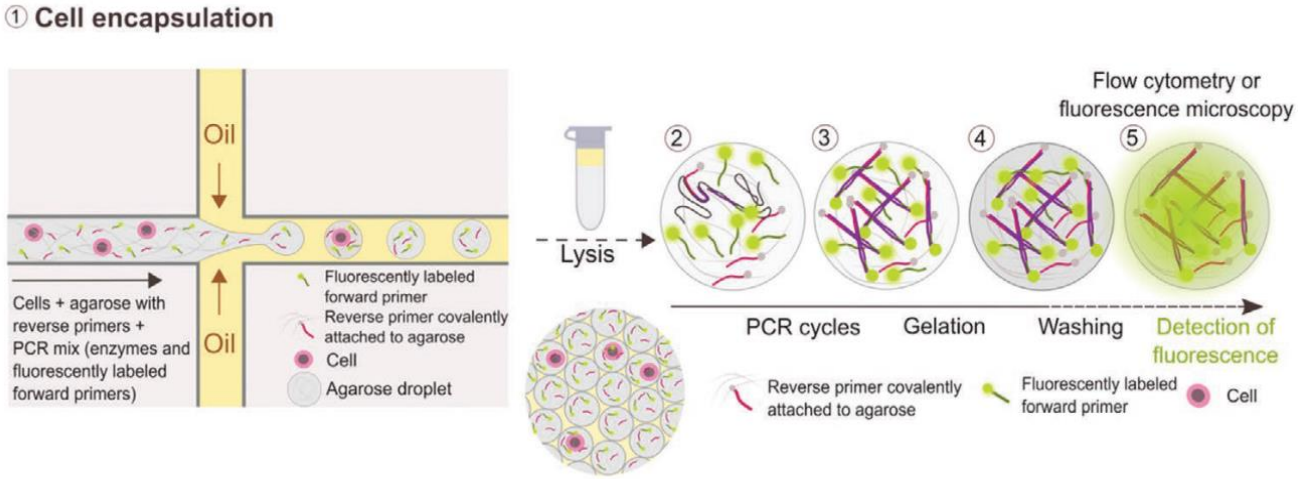


Figure 12 : Principe de la méthode de la PCR en gouttes d'agarose. Source : [13], adapté de [71].

Finalement, la méthode PACS (PCR-Activated Cell Sorting) [72] permet de trier des bactéries en se basant sur l'analyse de petites régions génomiques (centaines de bases). Les bactéries et les réactifs pour la PCR sont co-encapsulés en gouttes. Les cellules sont lysées et si leur ADN contient la séquence d'intérêt, une sonde TaqMan (qui possède un fluorophore et un quencher à proximité) s'y apparie. L'hydrolyse de la sonde par l'activité de la Taq polymérase détache le fluorophore qui est relâché en solution, ce qui augmente la fluorescence grâce à l'élimination de l'effet extincteur du quencher. Au cours de l'amplification PCR, l'intensité du signal fluorescent augmente à chaque cycle. Les gouttes fluorescentes sont ensuite triées pour une analyse du génome entier en aval.

c. Amplification de génome entier

Pour l'amplification du génome entier (WGA), les amorces utilisées s'attachent à plusieurs endroits du génome pour commencer la réplication. Différentes techniques d'amplification ont été développées [73], ce qui a représenté l'un des défis les plus importants pour l'analyse du génome

entier durant les dernières décennies. Nous ne comparons pas ici les méthodes d'amplification mais deux techniques de microfluidique de gouttes qui les utilisent pour l'analyse de cellules uniques.

Le système SiC-seq [74]a été la première plateforme pour l'analyse génomique de cellules uniques où la plupart des réactions sont effectuées en gouttes. La stratégie est que tout le matériel génomique d'une cellule unique est marqué avec un code-barres unique pour la cellule. Le processus comprend plusieurs étapes. Premièrement les gouttes de code-barres sont préparées en encapsulant des brins uniques d'ADN qui sont amplifiés par PCR en gouttes. Ensuite les gouttes de cellules uniques sont préparées en encapsulant les cellules dans des gouttes d'agarose qui sont solidifiées pour être transférées de l'huile vers une phase aqueuse. Les billes d'agarose sont perméables aux enzymes et aux petites molécules mais capturent les structures plus grandes comme l'ADN génomique. Les cellules sont ensuite digérées de sorte que les billes contiennent l'ADNg purifié. Celles-ci sont re-encapsulées dans des gouttes contenant les réactifs nécessaires pour fragmenter l'ADNg et attacher des séquences universelles qui servent de départ pour la PCR. Puis les gouttes sont fusionnées avec deux gouttes : une goutte contenant les réactifs pour la PCR et une goutte contenant les codes-barres. Les gouttes obtenues subissent les cycles thermiques pour la PCR. Finalement l'émulsion est cassée pour le séquençage. Les avantages de SiC-seq par rapport aux outils d'analyse de séquences ciblées du génome est que l'analyse du génome n'est pas biaisée et que toutes les étapes sont effectuées en microfluidique, ce qui limite les manipulations manuelles et augmente la reproductibilité. Cependant, les manipulations microfluidiques peuvent être plus complexes et prendre du temps.

CNV (Single Cell Copy Number Variation) est une plateforme commercialisée par 10X Genomics pour étudier l'hétérogénéité génomique de cellules uniques et l'évolution clonale à haut débit (centaines de milliers de cellules) [75]. Les cellules uniques sont encapsulées dans une matrice de gel. Une fois que les gouttes sont gélifiées, les cellules sont piégées à l'intérieur et peuvent subir la lyse et des lavages de manière similaire à SiC-seq pour ne garder que l'ADNg dans la bille de gel. Ces billes sont ensuite co-encapsulées avec des billes d'hydrogels portant des codes-barres et des enzymes. Les billes de gel contenant l'ADN et celles contenant les codes-barres peuvent être injectées proches les unes des autres ce qui permet une co-encapsulation efficace (environ 80% des gouttes contiennent une bille d'ADN et une bille de codes-barres). L'ADN contenu dans les gouttes est amplifié pour générer des librairies de cellules uniques avec un code-barres prêtes à être séquencées.

La microfluidique de gouttes a aussi été utilisée pour l'analyse de l'épigénome de cellules uniques. Rotem et al. ont pu identifier des sous-populations de cellules souches d'embryons de souris en analysant la chromatine de cellules uniques [76]. Ils utilisent une technique de codes-barres similaire aux méthodes précédentes en associant ces codes-barres à des cellules uniques.

3. Analyses transcriptomiques de cellules uniques en microfluidique de gouttes

L'ARNm est le type moléculaire le plus étudié avec les techniques de microfluidique pour l'analyse de cellules uniques. La présence de la queue polyadénylée sur l'ARNm exclusivement permet d'utiliser des amorces universelles composées de poly-T tout en évitant la contamination avec d'autres types d'ARN [18]. Nous présentons ici les trois plateformes de microfluidiques de gouttes pour l'analyse transcriptomique de cellules uniques qui sont le plus utilisées et qui sont adaptées dans des systèmes commercialisés. Ces trois méthodes se servent des gouttes pour co-encapsuler des cellules uniques et des billes qui transportent des codes-barres pour l'ARNm. Les principales différences dans ces méthodes sont le type de billes utilisées et la façon dont elles sont encapsulées.

a. La méthode Drop-seq

La méthode Drop-seq a été publiée en 2015 par Macosko et al. [22]. Le but de cette méthode est de capturer sur chaque bille l'ARNm d'une cellule unique, ce qui permet, une fois l'émulsion cassée, d'identifier la provenance de l'ARNm. En effet, chaque bille est fonctionnalisée par une suite de nucléotides composée de quatre parties : une séquence constante pour toutes les billes qui est utilisée comme point d'accroche pour les amorces lors de l'amplification, un code-barres unique pour chaque bille qui sert à identifier la cellule, un identifiant moléculaire unique (UMI) qui est unique pour chaque oligonucléotide afin d'identifier les duplicatas d'amplification, et une séquence poly-T pour capturer l'ARNm et qui sert d'amorce pour la rétrotranscription. Le processus microfluidique consiste simplement en une co-encapsulation de billes uniques et de cellules uniques, suivie de la lyse cellulaire et de la capture des ARNm sur les billes. L'émulsion est ensuite cassée pour procéder à la rétrotranscription puis à l'amplification par PCR (Figure 13).

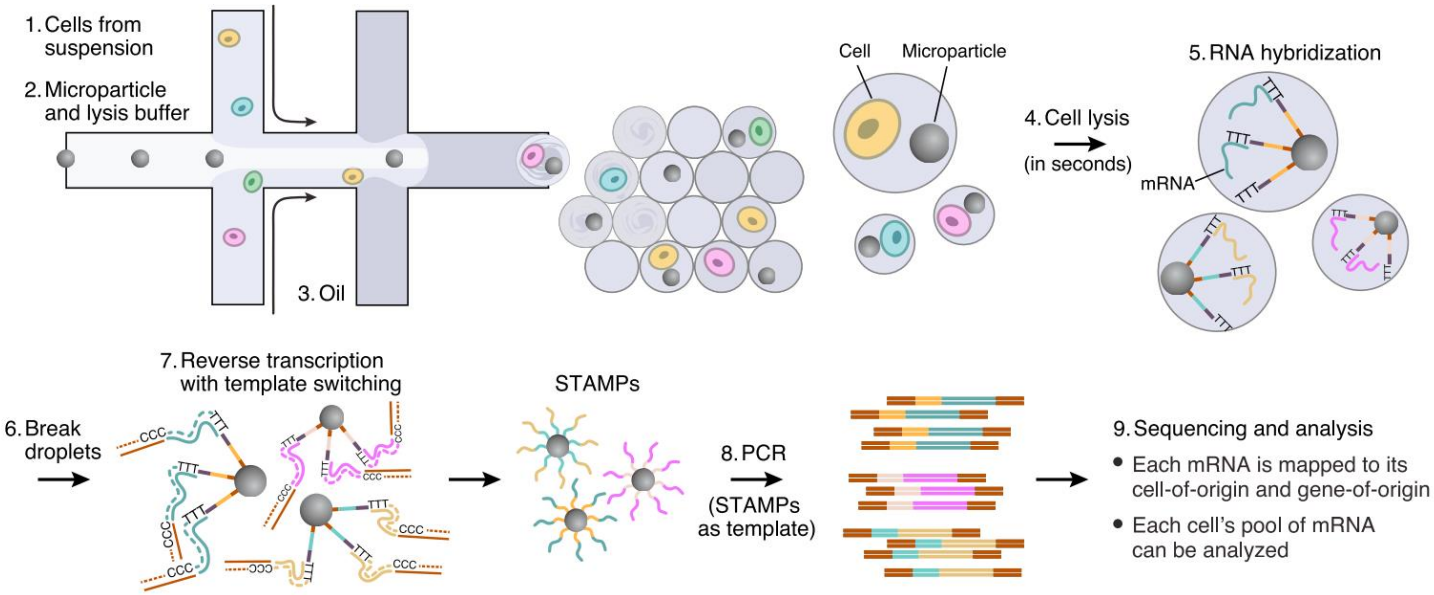


Figure 13 : Schéma de la méthode Drop-seq. Les gouttes sont formées à partir d'une solution contenant les cellules en suspension et une autre contenant les billes dans le tampon de lyse. La dilution est faite de sorte que chaque goutte ne contienne pas plus qu'une cellule et une bille. Une fois la cellule lysée, les ARNm sont capturés par les billes. Puis l'émulsion est cassée et la rétrotranscription ainsi que l'amplification sont effectuées. Source : [22].

Grâce à cette méthode, les auteurs ont analysé le transcriptome de plus de 40 000 cellules de rétine de souris, ont identifié 39 sous-populations cellulaires et ont créé un atlas moléculaire de l'expression génétique pour les classes de cellules rétiniennes.

Pour être sûr d'avoir au maximum une cellule et une bille par goutte, celles-ci doivent être très diluées et le remplissage des gouttes est donc soumis deux fois à la loi de Poisson qui est la loi de probabilité qui décrit la distribution des cellules dans les gouttes. Parmi les gouttes créées, il y a donc beaucoup de gouttes inutiles qui sont vides ou ne contiennent qu'une cellule sans bille ou une bille sans cellule. Le taux de capture de cellules est donc de 2 à 5 % du nombre de cellules injectées dans le système [77].

b. La méthode InDrop

Une seconde technique développée par Klein et al. appelée InDrop [23] permet de surmonter l'inefficacité imposée par la double loi de Poisson dans Drop-seq. En effet, les billes sont remplacées par des hydrogels d'acrylamide [78] qui peuvent être injectés dans la puce de façon compacte (Figure 14), proches les uns des autres, de sorte que le nombre de gouttes qui contiennent une bille d'hydrogel est de 90% donc presque toutes les cellules injectées peuvent

être analysées. Les billes d'hydrogels sont fonctionnalisées avec une suite de nucléotides comprenant une partie amorce pour l'amplification, un code-barres, un identifiant unique moléculaire et un brin poly-T. Dans le cas de InDrop l'ARNm n'est pas capturé par les billes mais les oligonucléotides sont libérés dans la solution grâce à un lien photoclivable. La rétrotranscription est faite en goutte puis l'émulsion est cassée pour l'amplification.

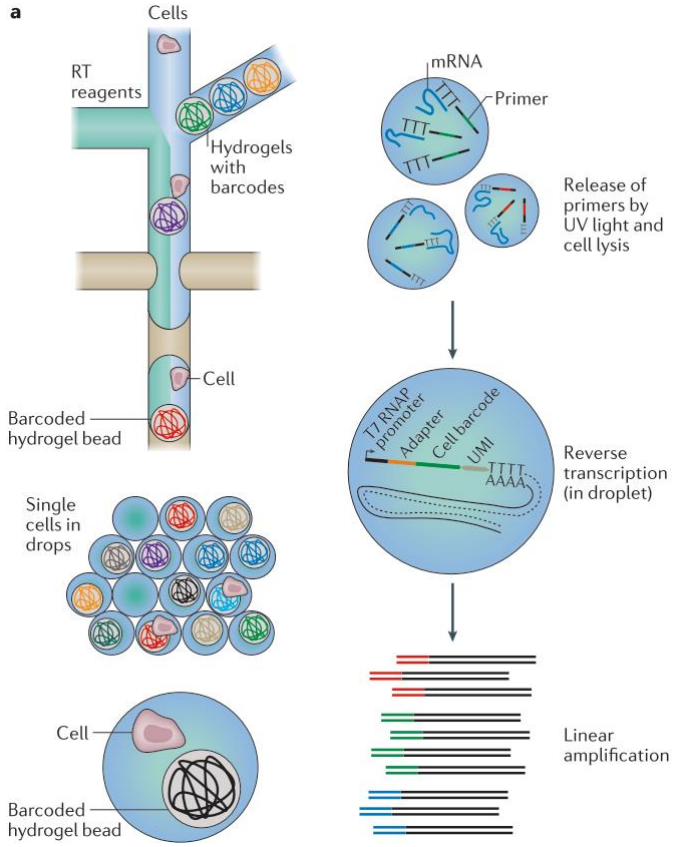


Figure 14 : Principe de la méthode InDrop. Les cellules et les billes d'hydrogels sont co-encapsulées de sorte que chaque cellule soit appariée avec une bille. Les oligonucléotides liés aux billes sont ensuite libérés dans la goutte et la cellule est lysée pour que les ARNm se fixent aux parties poly-T des amorces. Puis la rétrotranscription est effectuée en goutte et l'émulsion est cassée pour l'amplification. Source : [18], adapté de [23].

Ce système a été utilisé pour analyser plus de 11 000 cellules souches d'embryons de souris, ce qui a révélé la structure de la population et l'hétérogénéité cellulaire pendant la différentiation en réponse au retrait d'un facteur inhibiteur de la leucémie.

Le système InDrop est maintenant commercialisé par 1-Cell et son utilisation est actuellement revendiquée par une vingtaine de publications portant sur différents systèmes tels que le tissu bronchial humain [79], les globules rouges [80] ou le cortex visuel chez la souris [81].

c. La méthode de 10x Genomics

La méthode commercialisée par 10x Genomics peut être vue comme une combinaison des deux méthodes précédentes. Elle a été publiée par Zheng et al. en 2017 [82]. La co-encapsulation des billes de codes-barres et des cellules uniques suit le protocole de InDrop, tandis que la préparation de librairies avec la rétrotranscription et l'amplification PCR est similaire à Drop-seq. La différence notable entre le système de 10X Genomics et InDrop ou Drop-seq est l'utilisation de billes transportant les amorces qui se dissolvent après la co-encapsulation des cellules. La dissolution de ces billes semble être un facteur crucial dans l'identification d'un plus grand nombre de transcrits par cellules [13]. De plus, un avantage par rapport à Drop-seq et à InDrop est que huit échantillons peuvent être traités en parallèle.

La méthode de 10x Genomics a été utilisée pour étudier l'expression génétique de cellules uniques dans plus de 600 articles recensés sur www.10xgenomics.com/resources/publications.

Finalement, Zhang et al. ont comparé les trois systèmes [83] et notent qu'ils offrent une efficacité de détection du transcriptome satisfaisante dans les trois cas et qu'une meilleure efficacité est associée à un coût expérimental plus élevé. Selon eux 10x Genomics est une valeur sûre pour la plupart des applications, Drop-seq peut être plus rentable pour des expériences où il y a beaucoup d'échantillons et à l'inverse, dans le cas d'échantillons plus rares ou si il est nécessaire de modifier le protocole, InDrop devient un meilleur choix.

Nous avons vu dans cette partie que la microfluidique de gouttes est un outil particulièrement adapté à l'analyse de cellule unique et nous avons donné l'état de l'art en matière d'analyse génomique ou transcriptomique de cellules uniques en goutte. Les prochaines avancées de la microfluidique de goutte pour l'analyse de cellules uniques porteront probablement sur l'intégration de l'analyse de différents « omiques » sur un même système pour augmenter l'information obtenue par la mesure. Les progrès en termes de débits et du nombre de variables mesurées s'accompagnent des développements bio-informatiques qui permettent de traiter et mettre en relation le nombre croissant de données générées [84].

III. Analyses protéiques en microfluidique de gouttes

L'expression des protéines est ce qui caractérise véritablement l'état d'une cellule. En effet, la transcription de l'ARNm peut être bruitée par le caractère stochastique du processus alors que les protéines présentent en moyenne un plus haut niveau d'expression que l'ARNm et une plus grande stabilité par rapport au bruit de la transcription [18]. Contrairement à l'ARNm, les protéines n'ont pas de sonde universelle, ce qui complique le développement de méthodes de détection. De plus, il n'existe pas de technique pour l'amplification directe des protéines comme pour les acides nucléiques, donc la sensibilité de détection est primordiale pour l'identification d'espèces peu abondante dans des échantillons rares [85]. Nous nous intéressons dans cette partie à certaines des méthodes pour l'analyse protéique qui ont été implémentées en microfluidique de gouttes avant de nous focaliser sur celles qui combinent la microfluidique de goutte avec la spectrométrie de masse.

1. Méthodes pour l'analyse protéique en gouttes

a. Détection par séquençage

Après le développement d'outils d'analyse transcriptomique tels que inDrop et Drop-seq, la possibilité d'utiliser des technologies similaires pour l'analyse protéique de cellules uniques est apparue [13]. En 2017 Stoeckius et al [86] ont présenté l'indexation cellulaire du transcriptome et épitope par séquençage (CITE-seq) qui permet de quantifier simultanément le transcriptome et le protéome de cellules uniques en marquant les cellules avec des anticorps portant un brin d'ADN avant le processus microfluidique. Comme ce marquage doit être fait avant la lyse des cellules, cette technique ne permet d'avoir accès qu'aux protéines membranaires. Les cellules sont ensuite encapsulées en gouttes avec des billes portant des codes-barres comme dans le système Drop-seq et les brins d'ADN liés aux anticorps sont relâchés dans la goutte. Ces brins d'ADN ainsi que l'ARNm sont capturés par les billes codes-barres puis le processus est similaire à celui de Drop-seq avec la rétrotranscription, l'amplification et le séquençage qui permet d'identifier les protéines et ARNm présents initialement dans la cellule. La preuve de concept a été démontrée en utilisant 13 anticorps monoclonaux. Deux autres technologies similaires ont été développées à la même période : REAP-seq par Peterson et al [87] et Abseq par le groupe d'Abate [88]. 10X

Genomics, en collaboration avec Biolegend, a commercialisé une technologie utilisant le même principe sous le nom de Feature Barcoding Technology [89].

b. Détection par fluorescence

La détection par fluorescence est une approche non-destructive et qui peut être très sensible combinée avec des caméras ultra-sensibles et de filtres appropriés [90]. C'est une approche simple pour détecter de manière quantitative les informations d'un analyte spécifique de faible concentration et pour discriminer ses niveaux d'expression entre des gouttes différentes.

La méthode immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est un immunoessai standard en recherche clinique basé sur l'interaction antigène-anticorps. Il est très intéressant de chercher à miniaturiser et automatiser ce type d'essai afin de réduire les volumes de réactifs utilisés, notamment lors des nombreux lavages, et de diminuer la durée et la quantité de manipulations en laboratoire. Ces essais nécessitent un support solide pour la réaction de couplage antigène-anticorps. Les microbilles sont des substrats populaires car leur rapport surface/volume est avantageux par rapport à un substrat plan, ce qui améliore l'efficacité de l'interaction entre les anticorps et les analytes et donc augmente la sensibilité de l'essai [91]. Plusieurs expériences ont été faites en utilisant ces microbilles en gouttes pour des immunoessais. Par exemple en 2011 Konry et al publient une méthode qui permet de réaliser un ELISA sur des cellules uniques en gouttes [92]. Des cellules uniques sont encapsulées avec des billes fonctionnalisées avec des anticorps. Les analytes sécrétés par les cellules s'associent avec ces anticorps greffés et sont détectés grâce aux anticorps secondaires marqués en fluorescence présents dans les gouttes (Figure 15). Les gouttes sont guidées dans un canal d'incubation qui permet de quantifier la fluorescence par analyse d'image.

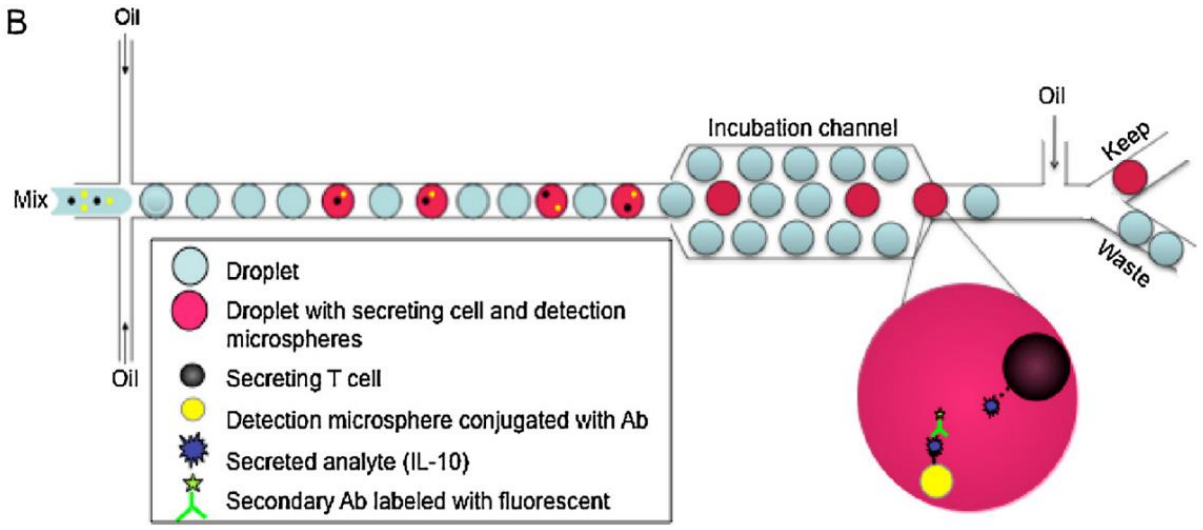


Figure 15 : Schéma de la configuration de la plateforme de microfluidique de goutte permettant de réaliser un immunoessai sur cellules uniques. Source : [92]

Les opérations manuelles pour suivre les gouttes, prendre et analyser les images peuvent rendre l'utilisation de ce type de système fastidieuse et difficilement transposable pour des diagnostiques cliniques. Des développements plus récents se sont donc portés sur l'automatisation de la détection avec peu d'étapes, une grande sensibilité et un débit important. Ainsi Tang et Shum [93] présentent un système qui utilise le même principe biochimique que l'expérience précédente avec un volume de réactifs divisé par 10 par rapport à un ELISA conventionnel, une sensibilité 10 fois meilleure et un débit d'environ 500 gouttes analysées par seconde grâce à un système de détection optique. Mazutis et al [94] présentent aussi un système utilisant le même principe pour détecter les anticorps sécrétés par des cellules hybridomes encapsulées dans des gouttes de 50 pL et trier les cellules.

La sécrétion par des cellules individuelles d'anticorps qui se lient à des antigènes spécifiques a été étudiée au cours du temps en utilisant la technologie DropMap [14]. Les cellules uniques sont compartimentalisées en gouttes avec environ 1300 nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec la molécule de capture, des anticorps de détection marqués en fluorescence, et des antigènes marqués en fluorescence (Figure 16). Les gouttes sont ensuite immobilisées dans une chambre d'observation et sont imagées en microscopie de fluorescence. Les anticorps sécrétés se lient aux billes de captures et sont visualisés par la liaison de l'anticorps secondaire fluorescent présent dans la goutte. L'application d'un champ magnétique induit la formation d'une ligne de nanoparticules facilement observable constituée par l'agrégation des nanoparticules. Le taux de sécrétion d'anticorps de chaque cellule est mesuré par l'intensité de la fluorescence des anticorps de détection situés sur la ligne de billes et l'affinité anticorps-antigène est mesurée par

l'intensité de la fluorescence des antigènes situés sur la ligne de billes. Cette technologie donne donc le taux de sécrétion d'un type d'anticorps par des cellules uniques ainsi que l'affinité anticorps-antigène. DropMap at été commercialisé par HiFiBio en 2019.

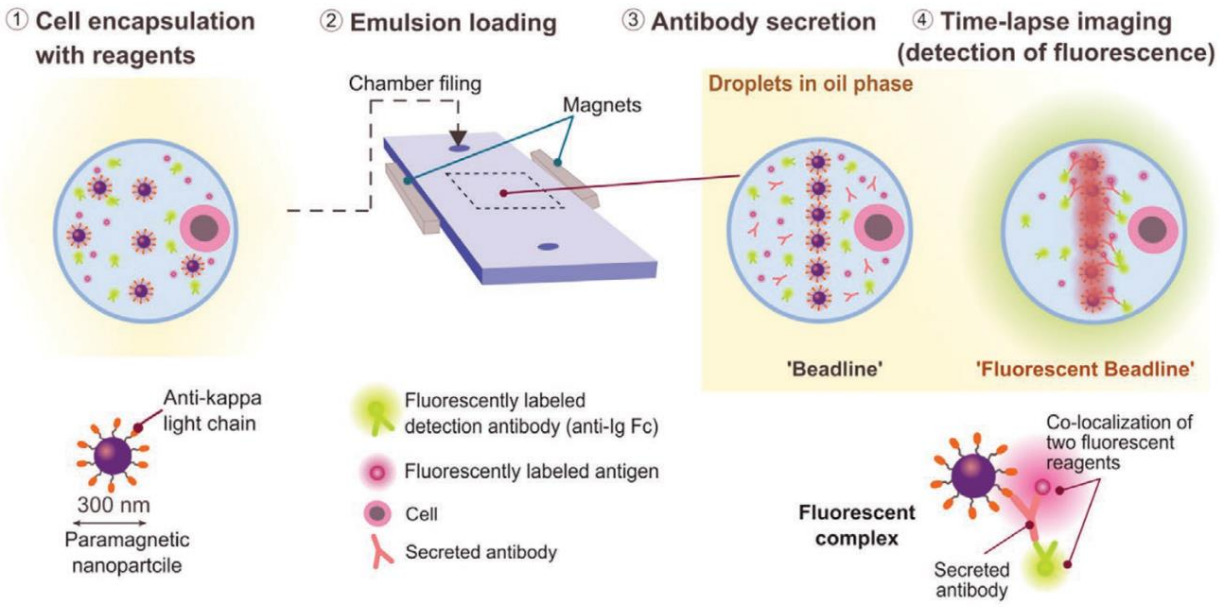


Figure 16 : Principe de la technologie DropMap pour l'étude de la sécrétion d'anticorps et de l'affinité à des antigènes spécifiques. Source : [13], adapté de [14].

Pour pouvoir réaliser des immunoessais complexes comme ceux réalisés en tube, avec par exemple des lavages, il devient nécessaire de pouvoir transférer les billes fonctionnalisées d'un réactif à l'autre. Dans notre équipe, Mai et al [95] ont utilisé la technologie des pinces magnétiques, présentée plus en détails dans le deuxième chapitre, pour réaliser un ELISA comprenant une série de 4 opérations. Un bras robotique est utilisé pour créer des trains de 5 gouttes de compositions différentes : une goutte contenant les billes magnétiques fonctionnalisées avec les anticorps, une goutte contenant l'échantillon, deux gouttes avec les solutions de lavage et une goutte avec la solution de détection (Figure 17, étape 1). Une petite bulle d'air est générée entre chaque goutte pour éviter qu'elles ne fusionnent. Grâce à la pince magnétique, les billes peuvent être manipulées d'une goutte à l'autre pour effectuer le protocole (Figure 17, étape 2) et la mesure finale de fluorescence est réalisée par un détecteur à LED.

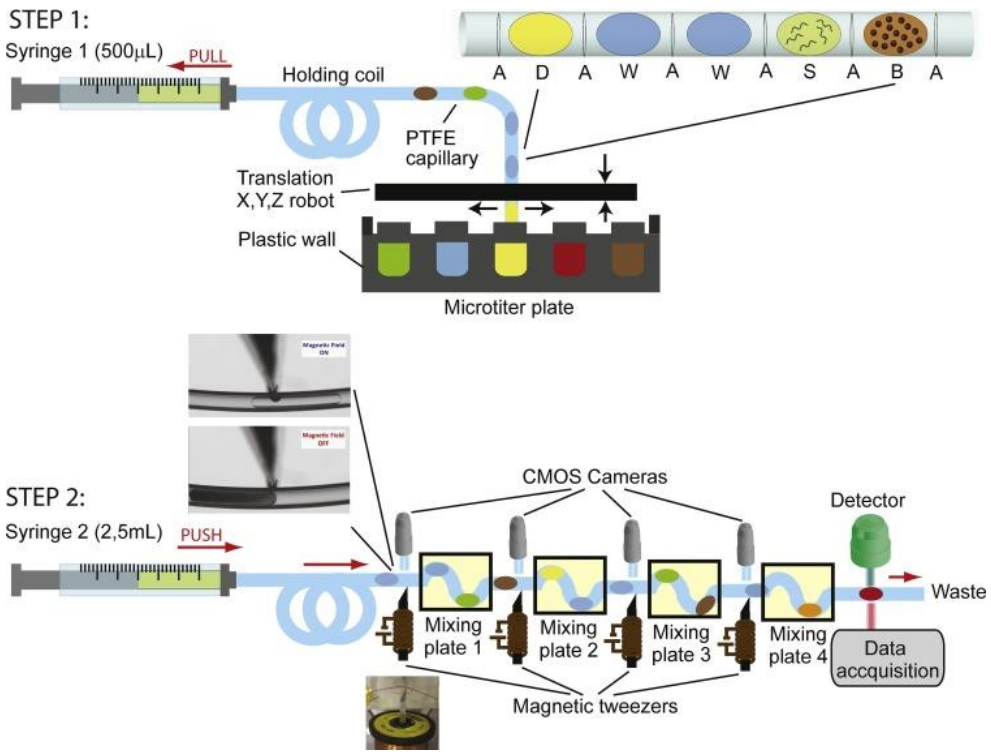


Figure 17 : Schéma du principe de l'immunoessai en goutte. En haut : Etape de formation d'un train de gouttes hétérogènes. En bas : parcours des gouttes pour effectuer les différentes étapes de l'immunoessai et la détection. Source : [95].

Cette plateforme a été adaptée pour la détection de deux peptides biomarqueurs utilisés pour le diagnostic moléculaire de la maladie d'Alzheimer. Le débit est de 8 immunoessais réalisés en 45 min avec un volume par échantillon de seulement 200 nL.

L'inconvénient majeur des techniques de détection par fluorescence est la nécessité d'un marqueur fluorescent qui soit spécifique à l'analyte d'intérêt. La spectroscopie de Raman, décrite ensuite, est une des techniques les plus utilisées combinée à la microfluidique de gouttes qui permet de s'affranchir de l'usage de marqueurs.

c. Spectroscopie de Raman

La spectroscopie de Raman est une technique analytique couramment utilisée qui donne des informations sur la structure chimique à partir du phénomène de diffusion inélastique des liaisons moléculaires lorsqu'elles sont irradiées. Les avantages de la spectroscopie de Raman sont qu'elle permet une détection rapide, sans marquages et non-destructive [96]. Couplée à la microfluidique

de gouttes, cette technique a, entre autres, été utilisée pour développer un système de tri de cellules encapsulées dans des gouttes [97]. L'inconvénient majeur de la spectroscopie de Raman est sa faible sensibilité qui limite l'étude d'analytes de faibles concentrations en gouttes. Cette sensibilité a pu être augmentée significativement avec la méthode SERS (surface-enhanced Raman spectroscopie) dans laquelle des nanoparticules et nanostructures métalliques servent de nano-antennes pour amplifier le signal. Cette technique a été largement appliquée couplée à la microfluidique de gouttes. Par exemple, Gao et al [98] ont appliqué cette technique à la détection simultanée de deux antigènes biomarqueurs du cancer de la prostate. Leur système automatisé semble cliniquement prometteur, présentant à la fois une grande sensibilité et une grande sélectivité.

d. Autres méthodes de détection

De nombreuses autres méthodes de détection pour l'analyse protéique ont été développées durant ses dernières années dont beaucoup sont présentées dans la revue de Liu et Zhu [96], telles que la détection par absorption et la spectroscopie photothermale ou optoacoustique. Selon eux la détection par résonnance magnétique nucléaire (RMN) est l'une des techniques qui va connaitre de nombreux développements avec la microfluidique de goutte. En effet, malgré sa relativement faible sensibilité de détection, la spectroscopie RMN est l'une des techniques les plus efficaces pour extraire des informations sur la structure et la dynamique moléculaire. Les derniers développements ont donc porté sur l'amélioration de la sensibilité en masse et des systèmes couplant microfluidique de gouttes et RMN commencent à émerger [99].

La spectrométrie de masse est aussi une des techniques qui semble les plus prometteuses couplées à la microfluidique de gouttes pour l'analyse protéique. Nous décrivons les récents développements dans la partie suivante.

2. Microfluidique de gouttes pour la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique utilisée pour mesurer le rapport masse sur charge d'ions. Elle peut identifier et détecter des peptides, des polymères, des protéines et des complexes de protéines. Les avantages de la spectrométrie de masse par rapport à d'autres techniques sont une détection sensible et sans recours à des marquages et la possibilité de

comprendre des structures chimiques, comme des informations structurales de protéines [100]. La spectrométrie de masse est devenue l'une des techniques analytiques les plus puissantes à disposition des chercheurs et est largement adoptée dans différents domaines dont la synthèse chimique, la biologie moléculaire, la biomédecine, l'alimentation et l'environnement [96]. Les deux techniques d'ionisation les plus populaires pour un couplage de la spectrométrie de masse avec la microfluidique sont l' « electrospray ionization » (ESI) et la désorption-ionisation laser assistées par matrice (MALDI) [101]. Nous décrivons ici les techniques qui couplent microfluidique de goutte et spectrométrie de masse.

a. ESI-MS

L'ionisation par électronébulisation (ESI) est la technique d'ionisation pour la spectrométrie de masse la plus populaire pour le couplage avec la microfluidique de goutte. Les ions sont générés directement à partir d'une solution liquide en appliquant simplement un haut voltage à la sortie d'un capillaire. Les émetteurs ESI peuvent être fabriqués sur les puces microfluidiques de génération de gouttes, ce qui permet une détection de gouttes à haut débit et de grande sensibilité [96]. Le plus gros défi du couplage de la spectrométrie de masse par ESI avec la microfluidique de gouttes est l'interférence de l'huile avec le procédé d'ionisation. Pour éviter cela, le groupe Kennedy a développé plusieurs systèmes où l'huile est évacuée en désaxant la pointe émettrice et le récepteur [102] et l'ionisation des gouttes aqueuses est très efficace. Ils ont par exemple démontré que leur interface couplant une puce de génération de gouttes et un émetteur ESI peut générer un signal stable pour des gouttes de 65pL à un débit de 10Hz [103]. Ce système a été utilisé pour le criblage d'inhibiteurs enzymatiques et a permis de révéler de nouvelles structures qui n'avaient pas été précédemment identifiées comme inhibitrices.

En plus du criblage, la MS-ESI couplée à la microfluidique de gouttes peut être utilisé pour du contrôle chimique *in vivo* [104]. Une sonde microfabriquée a été utilisée pour extraire des composés neurochimiques d'un cerveau de rat, qui ont ensuite été segmentés en gouttes pour atteindre une résolution temporelle de 6 s (Figure 18). L'intérêt de ce système a été démontré en contrôlant les changements chimiques dynamiques provoqués par des micro injections de forte concentration dans le cerveau du rat.

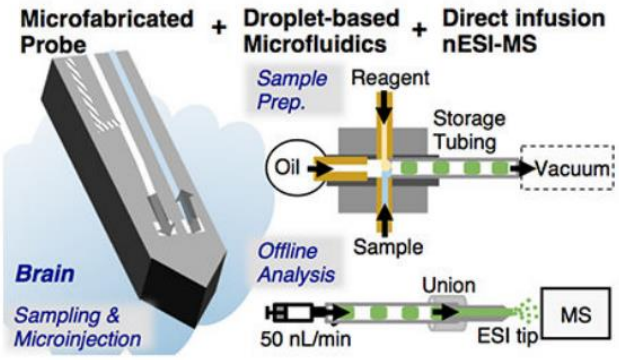


Figure 18 : Schéma du principe de l'expérience. A gauche : la sonde microfabriquée est insérée dans le tissu cérébral d'un rat. A droite : les gouttes sont générées à partir de l'échantillon mélangé aux réactifs puis directement analysées par spectrométrie de masse ESI. [104]

Pour analyser différents échantillons en gouttes, l'équipe de Fang a développé une série de méthodes qui permettent d'analyser le contenu de différentes gouttes disposées en quadrillage sur une plaque de nanopuits [105] [106] [107]. Par exemple, leur sonde en forme de cygne (swan probe) permet de générer des gouttes à partir de différents échantillons déposées dans des nanopuits (Figure 19). Le débit atteint avec ce système est de 256 gouttes analysées par ESI-MS en 90 minutes.

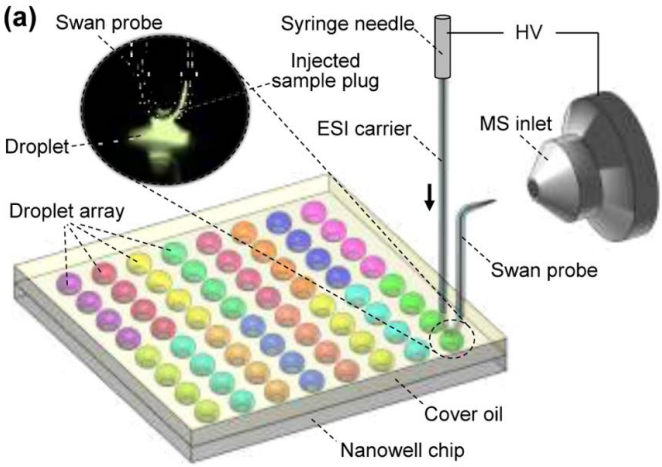


Figure 19 : Schéma de la configuration du système de la « Swan probe ». Les gouttes de 300 nL contenants différents échantillons sont déposées de façon automatisée dans des nanopuits. Les gouttes de 6 nL sont ensuite générées dans le capillaire grâce à la sonde puis directement analysées par ESI-MS. [106]

Globalement, la spectrométrie de masse ESI offre une approche simple pour connecter directement la spectrométrie de masse avec la microfluidique de goutte, et fournit une bonne sensibilité et précision sur la masse et des signaux reproductibles pour des analyses quantitative [85].

b. MALDI-MS

La spectrométrie de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) est une technique largement utilisée dans laquelle une impulsion laser volatilise et ionise l'analyte co-cristallisé avec une matrice acide et déposé sur une plaque en métal. Cette matrice sert de source de proton pour l'ionisation et absorbe l'énergie du laser efficacement pour la volatilisation. Comparé à la ESI-MS, la MALDI-MS est plus tolérante aux sels et aux autres contaminants d'échantillons, offre de très bonnes limites de détection et produit des spectres de masse qui sont relativement faciles à interpréter grâce à l'absence de charges multiples présentes dans la ESI-MS [85]. De plus, la MALDI-MS peut être appliquée à une grande gamme de poids moléculaire, avec une bonne sensibilité à plus de 300 kDa, contre moins de 100 kDa pour la ESI-MS, ce qui permet l'analyse de peptides et de protéines entières.

Küster et al, du groupe de Dittrich, ont été les premiers à utiliser la spectrométrie de masse MALDI pour l'analyse de gouttes à haut débit [108]. Les gouttes de 3 nL contenant les échantillons sont générées par une jonction T et sont déposées sur une plaque avec un revêtement hydrophobe qui contient plus de 26 000 emplacements hydrophiles (Figure 20). Le dépôt des gouttes est automatisée grâce à un système de détection optique qui synchronise la sortie des gouttes avec le mouvement du capillaire. La matrice est ajoutée en spray une fois que l'huile est évaporée.

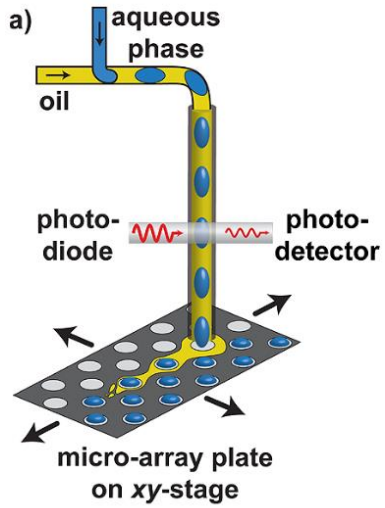


Figure 20 : Schémas du principe de la génération et déposition des gouttes sur la plaque. Source : [108].

Dans des études ultérieures, le même groupe a utilisé ce système pour suivre la sécrétion de protéines par des levures encapsulées en gouttes [109]. Récemment, ce groupe a aussi développé une technique pour séparer les levures de leur sécrétome juste avant l'ajout de matrice afin de ne pas détruire les cellules lors de l'analyse [110].

En 2017, Sarah Bregant et Florent Malloggi, avec qui nous avons collaboré pour les travaux présentés dans le troisième chapitre de cette thèse, ont montré avec leurs équipes que les gouttes peuvent être utilisées pour focaliser les analytes durant l'étape de déposition sur la plaque [111]. Leur hypothèse est que cette focalisation est due à des recirculations à l'intérieur de la goutte déposée créées par un effet Marangoni pendant l'évaporation de l'huile et des solutions aqueuses. Cet effet concentrateur est responsable d'une augmentation par un facteur 30 de l'amplitude du signal détecté par MALDI MS avec un peptide modèle (Figure 21). Dans leur expérience, les gouttes sont créées par une jonction T et déposées sur une plaque MALDI depuis le capillaire comme dans l'expérience précédente mais les échantillons sont déjà mélangés à la matrice avant la génération et le dépôt en gouttes, contrairement aux expériences du groupe de Petra Dittrich où la matrice est ajoutée après l'évaporation de l'huile. Ce système est décrit plus en détails dans le troisième chapitre de cette thèse.

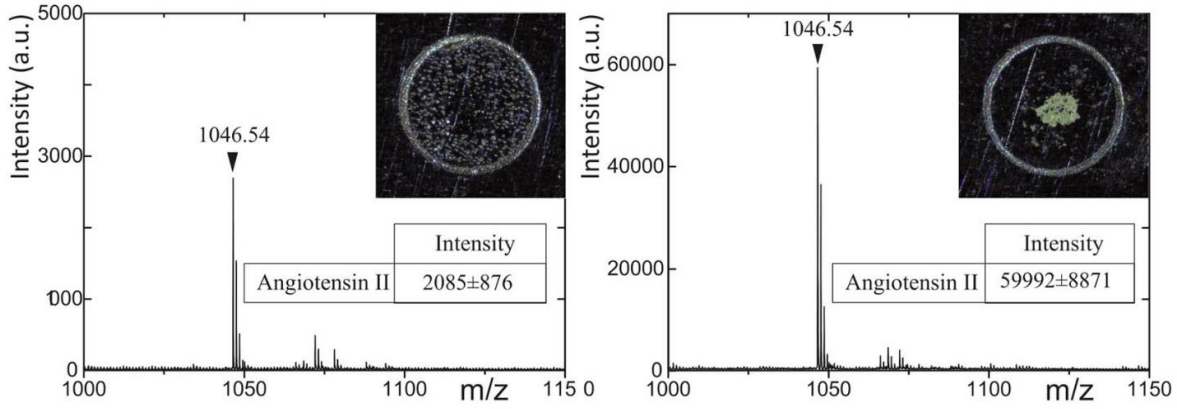


Figure 21 : Spectres MALDI MS de l'angiotensin II à 5 femtomoles. Gauche : déposition standard à la pipette. Droite : déposition en gouttes. Les inserts sont des photos de la co-cristallisation de la matrice avec l'analyte : celui avec la déposition en gouttes apparaît bien plus concentré que celui avec la déposition standard. [111]

Afin d'avoir un système le plus intégré possible, des équipes s'intéressent à associer des étapes de préparation d'échantillon en amont du dépôt de gouttes sur plaque MALDI. Ainsi Pereira et al [112] prennent avantage de la compartimentalisation des gouttes pour préserver la séparation des analytes réalisée par chromatographie liquide sur nano-colonnes (

Figure 22). Cette technique est particulièrement intéressante pour l'analyse d'échantillons complexes pour lesquels une séparation sur colonnes est nécessaire.

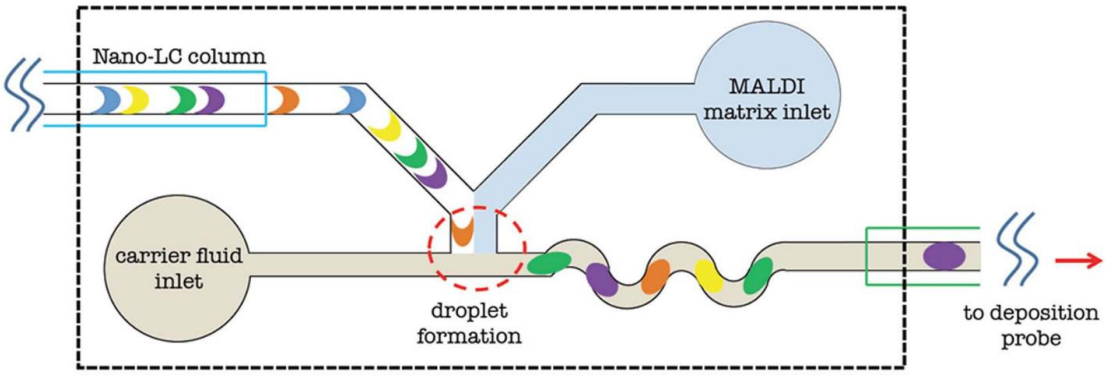


Figure 22 : Schéma de l'interface de chromatographie liquide sur colonnes et MALDI MS avec des gouttes. Les gouttes sont générées par une jonction T à partir de l'effluent de la chromatographie et la matrice MALDI. [112]

Il est intéressant de noter que contrairement à l'expérience de S. Bregant et F. Malloggi [111], Pereira et al cherchent à éliminer l'huile qui est la phase continue transportant les gouttes avant de déposer les échantillons sur la plaque. Ils montrent en effet que le dépôt de l'huile avec les gouttes créé une couche d'huile qui empêche la phase aqueuse de s'évaporer du mélange échantillon/matrice et retarde la cristallisation de la matrice. Ils observent alors l'apparition de bulles gazeuses entre la couche d'huile et la matrice et la concentration de l'analyte sur le contour de la goutte, ce qui rend la détection difficile. Dans l'expérience de S. Bregant et F. Malloggi, l'huile a un effet concentrateur de l'analyte. Cette différence peut s'expliquer par la différence d'huiles utilisées : Pereira et al utilisent l'huile fluorée FC-40 qui est peu volatile et s'évapore donc moins vite que la phase aqueuse alors que S. Bregant et F. Malloggi utilisent l'huile fluorée FC-72 qui est très volatile. Pour éviter les inconvénients créés par la présence de l'huile peu volatile sur leurs échantillons, Pereira et al utilisent une technique avec une membrane oléophile pour enlever l'huile à la sortie du capillaire et ne conserver que les gouttes « sèches ».

Finalement le couplage de la microfluidique de gouttes à la spectrométrie de masse est une technique prometteuse et en évolution. Pour améliorer l'automatisation des essais, il est très intéressant de chercher à intégrer les étapes de préparation d'échantillon en amont.

3. Préparation d'échantillons sur puce

Un prétraitement de l'échantillon, tel que la digestion enzymatique, le dessalage ou la concentration, est souvent nécessaire pour une analyse par spectrométrie de masse efficace. L'intégration de fonctions pour la préparation d'échantillon sur des puces microfluidiques couplées à la spectrométrie de masse permet de simplifier les procédures d'opérations, d'augmenter le débit d'analyse et d'automatiser le traitement des échantillons [113]. En particulier, une digestion efficace des protéines entières est une étape indispensable pour l'identification rapide et précise des protéines par l'empreinte en masse des peptides. Nous présentons dans cette partie les techniques de préparation d'échantillons sur puce en nous focalisant principalement sur l'étape de digestion des protéines.

a. Digestion avec enzymes en solution

L'une des premières puces dédiées à la préparation complète d'échantillons pour la spectrométrie de masse MALDI a été présentée en 2006 par Dodge et al [114]. Leur microsystème en PDMS effectue la séparation des protéines par électrophorèse, suivi par le confinement des protéines d'intérêt en utilisant des valves intégrées et la digestion enzymatique dans un micro mélangeur mécanique. L'enzyme est activée dans la puce pour minimiser l'autolyse. Les peptides obtenus sont transférés de la puce directement vers une plaque MALDI pour la spectrométrie de masse, avec ou sans une étape de dessalage sur micro colonne. Le temps total de l'analyse est de moins de 30 min et le volume d'échantillon est d'une dizaine de nL. Cependant cette technique n'est pas optimisée pour l'étude protéique et présente l'inconvénient majeur de la perte de matériel biologique par adsorption sur les parois en PDMS. De plus, les auteurs suggèrent de réaliser des étapes d'alkylation et de réduction pour améliorer l'efficacité de la digestion, qui ne sont pas intégrées sur la puce, tout comme l'étape de dessalage après la digestion.

Plus récemment, Ji et al [115] présentent une méthode de digestion en gouttes, ce qui permet d'éviter la perte d'échantillon, la contamination croisée et l'adsorption non spécifique par rapport aux autres méthodes [113]. Les protéines, séparées par chromatographie liquide, sont mélangées à une solution de trypsine et encapsulées en gouttes (Figure 23). Après une digestion à 37°C pendant 2 min en goutte, une solution tampon est introduite dans les gouttes pour modifier le pH et la matrice de l'échantillon pour le rendre compatible avec la ESI-MS.

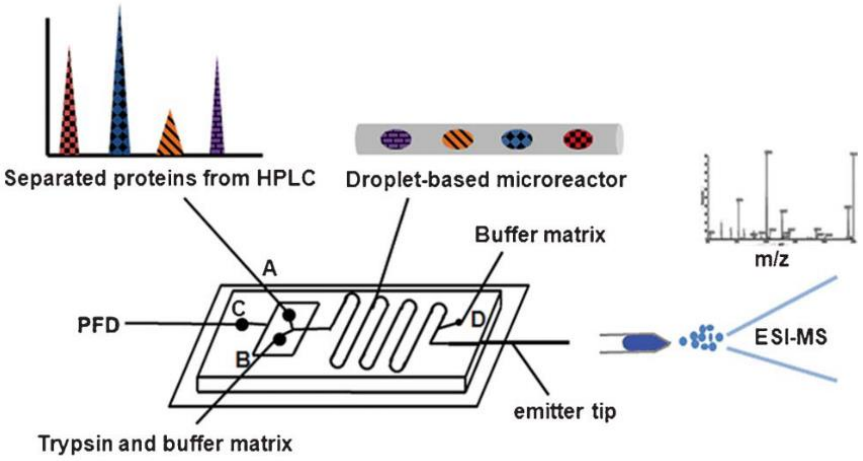


Figure 23 : Présentation schématique de la plateforme intégrée pour l'analyse de protéine combinant la séparation par chromatographie liquide, la digestion en goutte et l'identification des protéines par ESI-MS. Les protéines séparées sont injectées par l'entrée A, la solution de trypsine par l'entrée B, l'huile par l'entrée C et la solution tampon par l'entrée D.

L'inconvénient principal de la digestion en solution est que les enzymes libres peuvent s'auto-digérer, réduisant l'efficacité de la digestion et générant du bruit sur le spectre de masse dû aux produits d'autolyse.

b. Digestion avec enzymes immobilisées

La digestion avec un support solide utilise des enzymes immobilisées chimiquement ou adsorbées sur une surface solide. Ce type de digestion permet de réduire l'autolyse enzymatique et d'augmenter le rapport enzyme/substrat, résultant en une digestion plus efficace par rapport à la digestion en solution. Ces types de systèmes, appelés « IMERs » (immobilized enzyme reactors), sont de plus en plus miniaturisés pour obtenir une plus grande productivité par unité de volume et de temps [116] et pour les intégrer à un processus microfluidique. De plus la miniaturisation permet de réduire le coût de la procédure totale en consommant moins de réactifs, et de réduire le risque des opérations dans le cas de l'utilisation de substances inconnues ou dangereuses. L'efficacité d'un µ-IMER dépend, entre autres paramètres, de la géométrie du micro réacteur. Nous distinguons 3 types de géométries : monolithique, avec des particules et en tube ouvert (Figure 24).

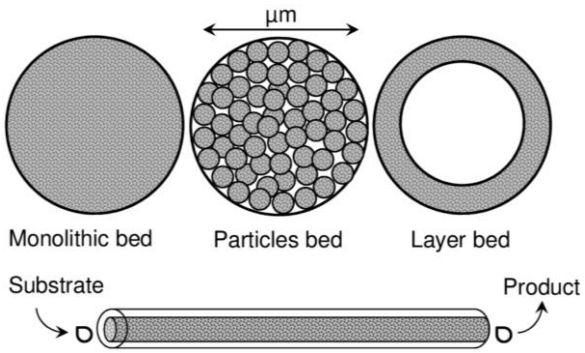


Figure 24 : Illustration des trois différentes géométries pour un µ-IMER. Source : [116].

i. Support ouvert

Le support ouvert est la géométrie la plus simple, les enzymes sont simplement greffées sur les parois du canal microfluidique. Par exemple, Lee et al [117] présentent un bioréacteur où la trypsine est liée de manière covalente aux parois en poly(méthyl méthacrylate) (PMMA) du canal microfluidique. Après la digestion, l'échantillon est mélangé à la matrice dans la puce puis directement déposé sur une plaque MALDI pour la spectrométrie de masse. Le taux de digestion est limité par la diffusion des protéines donc la même équipe a amélioré ce réacteur en introduisant une structure 3D dans le canal sous forme de micro piliers [118] pour réduire les distances.

Dans le cas du support ouvert la surface disponible est relativement faible et peut accueillir peu de d'enzymes. Lorsque la solution de substrat passe dans un capillaire, le rapport surface/ volume est faible comparé aux autres types de µ-IMERs, ce qui a un impact négatif sur l'efficacité de la digestion.

ii. Support monolithique

Le support monolithique est une structure d'une pièce traversée par de nombreux pores qui offrent une surface importante (Figure 25). En conséquence, les µ-IMERs à support monolithique présentent de très bonnes performances grâce à la réduction des trajets de diffusion et le transfert de masse rapide, avec une contre-pression relativement faible grâce à des pores macroscopiques qui permettent le passage du flux. L'efficacité de la digestion dans un monolithe permet de réduire considérablement la durée du processus d'analyse [119].

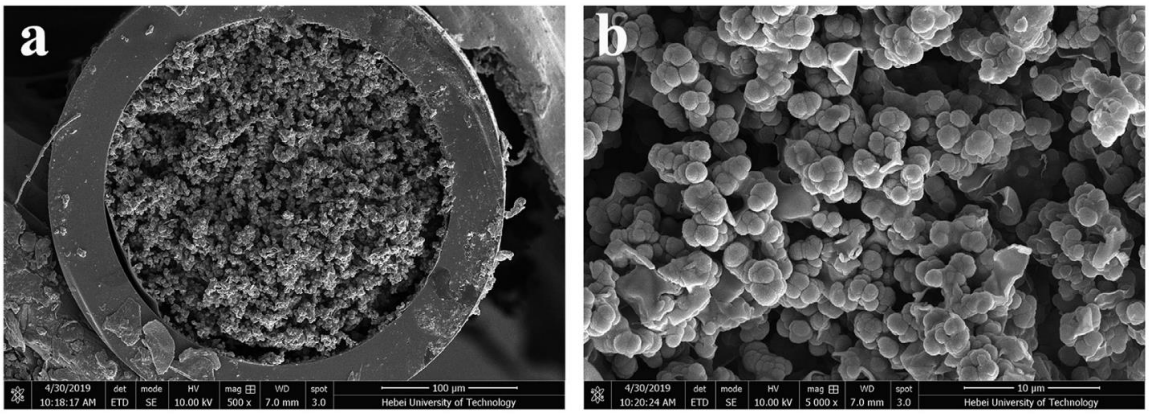


Figure 25 : Images par microscopie électronique à balayage (a x 500, b x 5000) d'un monolithe formé dans un capillaire pour être fonctionnalisé avec de la trypsine. Source : [120]

Il est intéressant de noter que les supports monolithiques sont synthétisés directement dans les microcanaux, ce qui permet d'éviter les difficultés liées à la concentration des billes avec l'utilisation de particules comme support. En revanche leur préparation peut prendre beaucoup de temps et est souvent confrontée à des problèmes de reproductibilité [116].

iii. Particules comme support

L'usage de micro particules comme support pour l'immobilisation d'enzymes est assez répandue. Par exemple, Wang et al [121] ont utilisé des billes de résine fonctionnalisée avec de la trypsine pour créer un lit pour la digestion protéique sur puce, qu'ils ont intégré avec une étape d'extraction [122], et interfacé avec un spectromètre de masse par ESI. Les billes sont plus grandes que les microcanaux de la puce microfluidique de sorte qu'elles sont contenues dans des chambres dédiées à la digestion à travers lesquelles la solution d'échantillon passe (Figure 26).

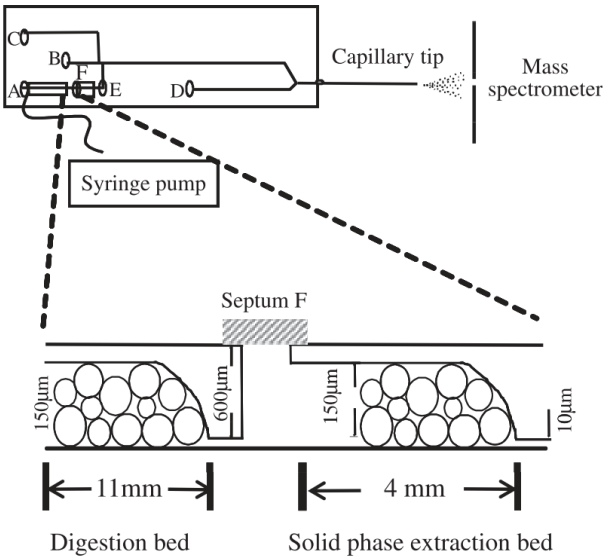


Figure 26 : schéma de la puce de préparation d'échantillon. Les dessins du bas montrent le détail des chambres dans lesquelles des billes de 40 à 60 µm de diamètre sont piégées. Source : [122].

Plus récemment, Kecskemeti et Garpar [123] ont rapporté un IMER réalisé avec des billes de silices sur lesquelles de la trypsine est immobilisé de manière covalente par la méthode EDC/NHS. La concentration des billes est une étape cruciale dans leur protocole car les billes doivent être suffisamment compactées pour obtenir une protéolyse reproductible et efficace. Les billes sont retenues dans la chambre de la même manière que précédemment et sont compactées en maintenant un flux. Grâce à une concentration importante de trypsine en surface, la digestion est très rapide et peut être réalisée en 1 minute alors que la digestion standard dure 16h, avec des profils de peptides obtenus similaires ou équivalents entre les deux méthodes.

L'avantage d'utiliser des billes magnétiques est qu'elles sont manipulables avec un champ magnétique extérieur donc plus faciles à placer dans la puce et à enlever après la digestion enzymatique. Une méthode a été développée dans notre laboratoire, avec des collaborateurs, qui utilise la force magnétique pour garder les billes, fonctionnalisées avec de la trypsine, concentrées quand un flux contenant l'échantillon les traverse [124] [125]. Un microcanal est placé entre deux aimants permanents qui qui créent un champ magnétique perpendiculaire au flux avec un gradient important. Cela permet la formation d'une zone concentrée en billes magnétiques à faible résistance hydrodynamique qui sert de matrice pour la digestion protéique (Figure 27).

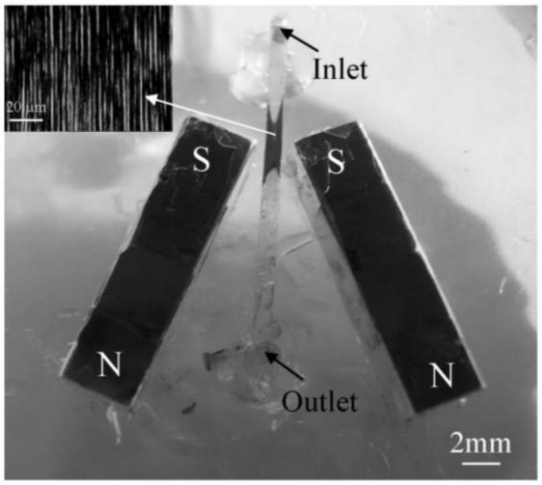


Figure 27 : Micro réacteur avec les billes magnétiques maintenues entre les deux aimants. L'insert est une microphotographie x100 des colonnes de bille au début de la concentration des billes. Source : [124]

Ce système a notamment été utilisé pour la détection de protéines prions pathogènes par digestion par protéinase K suivie d'un Western Blot [126]. L'évaluation des performances de cet IMER que la cinétique de réaction est accélérée typiquement d'un facteur 100 comparé aux réactions conventionnelles et que la reproductibilité est très bonne.

Ce principe d'équilibre entre force magnétique et force de trainée pour créer une matrice de billes magnétiques a aussi été appliqué plus récemment dans notre équipe avec le développement du lit fluidisé. Cette géométrie a notamment été utilisée pour la digestion enzymatique de la transthyrétine, nécessaire à la détection d'une maladie rare [127]. Dans cette étude, l'efficacité de la digestion est comparée à celle d'un µ-IMER monolithique. Il est observé que les billes magnétiques ont tendance à s'agréger lorsqu'elles sont fonctionnalisées, ce qui crée des inhomogénéités dans la matrice de billes et peut être responsable d'un taux de réaction inférieur par rapport au µ-IMER monolithique.

Finalement nous avons montré dans cette partie que la microfluidique a permis le développement d'une grande variété de systèmes intégrés pour l'analyse protéique de cellules uniques ou multiples. Nous avons décrit en particulier les systèmes qui combinent la microfluidique de goutte avec la spectrométrie de masse et la préparation d'échantillon puisque c'est dans cette lignée que s'inscrivent les travaux réalisés pendant cette thèse.

IV. Conclusion

Ce chapitre décrit l'état de l'art de la miniaturisation de certaines méthodes bioanalytiques, notamment pour les analyses génomiques, transcriptomiques et protéomiques. Dans une première partie, les intérêts et enjeux de l'analyse multi-omique sur cellules uniques ont été montrés et nous avons vu quelles sont les méthodes de bioanalyse macroscopiques qui permettent de réaliser de telles analyses. Ces méthodes sont complexes et possèdent un débit d'analyse faible, d'où l'intérêt de les miniaturiser en utilisant la microfluidique qui permet de réduire les volumes de réaction, et donc souvent les coûts et la durée d'un essai, d'automatiser les processus et intégrer différentes étapes pour augmenter le débit d'analyse. La plupart des systèmes de microfluidique existants actuellement pour réaliser des analyses multi-omiques sont composés d'un réseau de valves, qui sont facilement contrôlables mais nécessitent une microfabrication à plusieurs niveaux et un contrôle pneumatique qui peut devenir complexe lors de l'intégration d'un grand nombre de valves.

La deuxième partie de ce chapitre est focalisée sur les techniques d'analyses de génome et de transcriptome utilisant la microfluidique de gouttes. Plusieurs de ces systèmes sont actuellement commercialisés et permettent l'analyse, notamment du transcriptome, de cellules uniques à haut débit. Cependant, à notre connaissance, aucun système de microfluidique de goutte ne permet l'analyse simultanée du génome et du transcriptome de cellules uniques. C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet présenté dans le chapitre 2, dont le but est de fournir de nouveaux outils basés sur la microfluidique de gouttes et l'extraction de particules magnétiques pour l'analyse multi-omique de cellules uniques.

Enfin, la troisième partie de ce chapitre présente différentes techniques pour l'analyse protéomique en microfluidique de gouttes. Les avantages de la spectrométrie de masse par rapport à d'autres techniques sont une détection sensible et sans recours à des marquages et la possibilité de comprendre des structures chimiques, comme des informations structurales de protéines. La spectrométrie de masse MALDI-TOF est rarement couplée à la microfluidique de goutte car elle ne peut pas être directement intégrée à une puce microfluidique comme l'ESI-MS. Cependant, les systèmes existants montrent qu'il y a un réel intérêt à ce couplage pour tirer parti des avantages apportés par la microfluidique de gouttes et des très bonnes performances de détection de la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le troisième chapitre de cette thèse présente une approche de microfluidique de gouttes pour l'analyse de protéines par MALDI-TOF MS : de la préparation d'échantillon en goutte par digestion enzymatique à la déposition sur plaque et la concentration locale des peptides.

Bibliographie

[1] F. Crick, «Central dogma of molecular biology,» *Nature,* vol. 227, pp. 561-563, 1970.

[2] M. Lu et X. Zhan, «The crucial role of multiomic approach in cancer research and clinically relevant outcomes,» *EPMA Journal,* vol. 9, pp. 77-102, 2018.

[3] Y. Hu, Q. An, K. Sheu, B. Trejo, S. Fan et Y. Guo, «Single cell multi-omics technology: methodology and application,» *Frontiers in Cell and Developmental Biology,* vol. 6, pp. 1-13, 2018.

[4] I. C. Macaulay, C. P. Ponting et T. Voet, «Single cell multiomics : multiple measurements from single cells,» *Trends in Genetics,* vol. 33, pp. 155-168, 2017.

[5] K. Leonavicius, J. Nainys, D. Kuciauskas et L. Mazutis, «Multi-omics at single-cell resolution: comparison of experimental and data fusion approaches,» *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 55, pp. 159-166, 2019.

[6] Y. Wang, J. Waters, M. L. Leung, A. Unruh, W. Roh, X. Shi, K. Chen, P. Scheet, S. Vattathil, H. Liang, A. Multani, H. Zhang, R. Zhao, F. Michor, F. Meric-Bernstam et N. E. Navin, «Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing,» *Nature,* vol. 512, pp. 155-160, 2014.

[7] M. L. Leung, A. Davis, R. Gao, A. Casasent, Y. Wang, E. Sei, E. Vilar, D. Maru, S. Kopetz et N. E. Navin, «Single-cell DNA sequencing reveals a late- dissemination model in metastatic colorectal cancer,» *Genome Research,* vol. 27, pp. 1287-1299, 2017.

[8] A. Saadaptour, S. Lai, G. Guo et G.-C. Yuan, «Single-cell analysis in cancer genomics,» *Trends in Genetics,* vol. 31, pp. 576-586, 2015.

[9] G. Kesley, O. Stegle et W. Reik, «Single-cell epigenomics: Recording the past and predicting the future,» *Science,* vol. 358, pp. 69-75, 2017.

[10] K. Grosselin, A. Durand, J. Marsolier, A. Poitou, E. Marangoni, F. Nemati, A. Dahmani, S. Lameiras, F. Reyal, O. Frenoy, Y. Pousse, M. Reichen, A. Woolfe, C. Brenan, A. D. Griffiths, C. Vallot et A. Gérard, «High-throughput single-cell ChIP-seq identifies heterogeneity of chromatin states in breast cancer,» *Nature Genetics,* vol. 51, pp. 1060-1066, 2019.

[11] F. Tang, C. Barbacioru, Y. Wang, E. Nordman, C. Lee, N. Xu, X. Wang, J. Bodeau, B. B. Tuch, A. Siddiqui, K. Lao et M. A. Surani, «mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell,» *Nature Methods,* vol. 6, pp. 377-382, 2009.

[12] B. Hwang, J. H. Lee et D. Bang, «Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines,» *Experimental & Molecular Medicine,* vol. 50, 2018.

[13] K. Matula, F. Rivello et W. T. S. Huck, «Single-cell analysis using droplet microfluidics,» *Advanced Biosystems,* vol. 4, 2020.

[14] K. Eyer, R. C. L. Doineau, C. E. Castrillon, L. Briseño-Roa, V. Menrath, G. Mottet, P. England, A. Godina, E. Brient-Litzler, C. Nizak, A. Jensen, A. D. Griffiths, J. Bibette, P. Bruhns et J. Baudry, «Single-cell deep phenotyping of IgG-secreting cells for high-resolution immune monitoring,» *Nature Biotechnology,* vol. 35, pp. 977-982, 2017.

[15] C. Thiele, K. Wunderling et P. Leyendecker, «Multiplexed and single cell tracing of lipid metabolism,» *Nature Methods,* vol. 16, pp. 1123-1130, 2019.

[16] A. K. Shalek, R. Satija, X. Adiconis, R. S. Gertner, J. T. Gaublomme, R. Raychowdhury, S. Schwartz, N. Yosef, C. Malboeuf, D. Lu, J. J. Trombetta, D. Gennert, A. Gnirke, A. Goren, N. Hacohen, J. Z. Levin, H. Park et A. Regev, «Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells,» *Nature,* vol. 498, pp. 236-240, 2013.

[17] M. B. Elowitz, A. J. Levine, E. D. Siggia et P. S. Swain, «Stochastic Gene Expression in a Single Cell,» *Science,* vol. 297, pp. 1183-1186, 2002.

[18] S. M. Prakadan, A. K. Shalek et D. A. Weitz, «Scaling by shrinking: empowering single-cell 'omics' with microfluidic devices,» *Nature Reviews Genetics,* vol. 18, pp. 345-361, 2017.

[19] F. Pelon, B. Bourachot, Y. Kieffer, I. Magagna, F. Mermet-Meillon, I. Bonnet, A. Costa, A.-M. Givel, Y. Attieh, J. Barbazan, C. Bonneau, L. Fuhrmann, S. Descroix, D. Vignjevic, P. Silberzan, M. C. Parrini, A. Vincent-Salomon et F. Mechta-Grigoriou, «Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms,» *Nature Communications,* vol. 11, 2020.

[20] Y. Wang et N. E. Navin, «Advances and applications of single-cell sequencing technologies,» *Molecular Cell,* vol. 58, pp. 598-609, 2015.

[21] A. A. Pollen, T. J. Nowakowski, J. Shuga, X. Wang, A. A. Leyrat, J. H. Lui, N. Li, L. Szpankowski, B. Fowler, P. Chen, N. Ramalingam, G. Sun, M. Thu, M. Norris, R. Lebofsky, D. Toppani, D. W. Kemp II, M. Wong, B. Clerkson, B. N. Jones, S. Wu, L. Knutsson et al, «Low-coverage single-cell mrNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex,» *Nature Biotechnology,* vol. 32, pp. 1053-1058, 2014.

[22] E. Z. Macosko, A. Basu, R. Satija, J. Nemesh, K. Shekhar, M. Goldman, I. Tirosh, A. R. Bialas, N. Kamitaki, E. M. Martersteck, J. J. Trombetta, D. A. Weitz, J. R. Sanes, A. K. Shalek, A. Regev et S. A. McCarroll, «Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets,» *Cell,* vol. 161, pp. 1202-1214, 2015.

[23] A. M. Klein, L. Mazutis, I. Akartuna, N. Tallapragada, A. Veres, V. Li, L. Peshkin, D. A. Weitz et M. W. Kirschner, «Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells,» *Cell,* vol. 161, pp. 1187-1201, 2015.

[24] R. M. Kumar, P. Cahan, A. K. Shalek, R. Satija, A. J. DaleyKeyser, H. Li, J. Zhang, K. Pardee, D. Gennert, J. J. Trombetta, T. C. Ferrante, A. Regev, G. Q. Daley et J. J. Collins, «Deconstructing transcriptional heterogeneity in pluripotent stem cells,» *Nature,* vol. 516, pp. 56-61, 2014.

[25] W. Chung, H. H. Eum, H.-O. Lee, K.-M. Lee, H.-B. Lee, K.-T. Kim, H. S. Ryu, S. Kim, J. E. Lee, Y. H. Park, Z. Kan, W. Han et W.-Y. Park, «Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer,» *Nature Communications,* vol. 8, 2017.

[26] A. Zeisel, A. B. Muñoz-Manchado, S. Codeluppi, P. Lönnerberg, G. La Manno, A. Juréus, S. Marques, H. Munguba, L. He, C. Betsholtz, C. Rolny, G. Castelo-Branco, J. Hjerling-Leffler et S. Linnarsson, «Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq,» *Science,* vol. 347, pp. 1138-1142, 2015.

[27] N. Navin, J. Kendall, J. Troge, P. Andrews, L. Rodgers, J. McIndoo, K. Cook, A. Stepansky, D. Levy, D. Esposito, L. Muthuswamy, A. Krasnitz, W. R. McCombie, J. Hicks et M. Wigler, «Tumour evolution inferred by single-cell sequencing,» *Nature,* vol. 472, pp. 90-94, 2011.

[28] S. S. Dey, L. Kester, B. Spanjaard, M. Bienko et A. van Oudenaarden, «Integrated genome and transcriptome sequencing from the same cell,» *Nature Biotechnology,* vol. 33, pp. 285-289, 2015.

[29] I. C. Macaulay, W. Haerty, P. Kumar, Y. I. Li, T. X. Hu, M. J. Teng, M. Goolam, N. Saurat, P. Coupland, L. M. Shirley, M. Smith, N. Van der Aa, R. Banerjee, P. D. Ellis, M. A. Quail, H. P. Swerdlow, M. Zernicka-Goetz, F. J. Livesey, C. P. Ponting et T. Voet, «G&t-seq: parallel sequencing of single- cell genomes and transcriptomes,» *Nature Methods,* vol. 12, pp. 519-522, 2015.

[30] I. C. Macaulay, M. J. Teng, W. Haerty, P. Kumar, C. P. Ponting et T. Voet, «Separation and parallel sequencing of the genomes and transcriptomes of single cells using G&T-seq,» *Nature Protocole,* vol. 11, pp. 2081-2103, 2016.

[31] Y. Hu, K. Huang, Q. An, G. Du, G. Hu, J. Xue, X. Zhu, C.-Y. Wang, Z. Xue et G. Fan, «Simultaneous profiling of transcriptome and DNA methylome from a single cel,» *Genome Biology,* 2016.

[32] Y. Hou, H. Guo, C. Cao, X. Li, B. Hu, P. Zhu, X. Wu, L. Wen, F. Tang, Y. Huang et J. Peng, «Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas,» *Cell Research,* vol. 26, pp. 304-319, 2016.

[33] K. Y. Han, K.-T. Kim, J.-G. Joung, D.-S. Son, Y. J. Kim, A. Jo, H.-J. Jeon, H.-S. Moon, C. E. Yoo, W. Chung, H. H. Eum, S. Kim, H. K. Kim, J. E. Lee, M.-J. Ahn, H.-C. Lee, D. Park et W.-Y. Park, «SIDR: simultaneous isolation and parallel sequencing of genomic DNA and total RNA from single cells,» *Genome research,* vol. 28, pp. 75-87, 2018.

[34] A. Ahadi, S. Brennan, P. J. Kennedy, G. Hutvagner et N. Tran, «Long non-coding RNAs harboring miRNA seed regions are enriched in prostate cancer exosomes,» *Scientific Reports,* vol. 6, 2016.

[35] X. Ni, M. Zhuo, Z. Su, J. Duan, Y. Gao, Z. Wang, C. Zong, H. Bai, A. R. Chapman, J. Zhao, L. Xu, T. An, Q. Ma, Y. Wang, M. Wu, Y. Sun, S. Wang, Z. Li, X. Yang, J. Yong, X.-D. Su, Y. Lu, F. Bai, S. Xie et J. Wang, «Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients,» *PNAS,* vol. 110, pp. 21083-21088, 2013.

[36] N. Andor, T. A. Graham, M. Jansen, L. C. Xia, A. Aktipis, C. Petritsch, H. P. Ji et C. C. Maley, «Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity,» *Nature Medicine,* vol. 22, pp. 105-113, 2016.

[37] E. Shapiro, T. Biezuner et S. Linnarsson, «Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science,» *Nature Reviews Genetics,* vol. 14, pp. 618-630, 2013.

[38] E. K. Sackmann, A. L. Fulton et D. J. Beebe, «The present and future role of microfluidics in biomedical research,» *Nature,* vol. 507, pp. 181-189, 2014.

[39] P. Mitchell, «Microfluidics—downsizing large-scale biology,» *Nature Biotechnology,* vol. 19, pp. 717-721, 2001.

[40] J. W. Hong et S. R. Quake, «Integrated nanoliter systems,» *Nature Biotechnology,* vol. 21, pp. 1179-1183, 2003.

[41] L. Han, X. Zi, L. X. Garmire, Y. Wu, S. M. Weissman, X. Pan et R. Fan, «Co-detection and sequencing of genes and transcripts from the same single cells facilitated by a microfluidics platform,» *Scientific Reports,* vol. 4, 2014.

[42] S. Darmanis, J. C. Gallant, V. D. Marinescu, M. Niklasson, A. Segerman, G. Flamourakis, S. Fredriksson, E. Assarsson, M. Lundberg, S. Nelander, B. Westermark et U. Landegren, «Simultaneous multiplexed measurement of RNA and proteins in single cells,» *Cell Reports,* vol. 14, pp. 380-389, 2016.

[43] A. S. Genshaft, S. Li, C. J. Gallant, S. Darmanis, S. M. Prakadan, C. G. K. Ziegler, M. Lundberg, S. Fredriksson, J. Hong, A. Regev, K. A. Livak, U. Landegren et A. Shalek, «Multiplexed, targeted profiling of single-cell proteomes and transcriptomes in a single reaction,» *Genome Biology,* vol. 17, 2016.

[44] H. Gong, X. Wang, B. Liu, S. Boutet, I. Holcomb, G. Dakshinamoorthy, A. Ooi, C. Sanada, G. Sun et R. Ramakrishnan, «Single-cell protein-mRNA correlation analysis enabled by multiplexed dual-analyte co-detection,» *Scientific Reports,* vol. 7, pp. 1-8, 2017.

[45] A. M. Xu, Q. Liu, K. L. J. S. Takata, Y. Su, I. Antoshechkin, S. Chen, M. Thomson et J. R. Heath, «Integrated measurement of intracellular proteins and transcripts in single cells,» *Lab on a Chip,* vol. 18, pp. 3251-3262, 2018.

[46] L. Strotman, R. O'Connell, B. P. Casavant, S. M. Berry, J. M. Sperger, J. M. Lang et D. J. Beebe, «Selective nuceic acid removal via exclusion (SNARE): capturing mRNA and DNA from a single sample,» *Analytical Chemistry,* vol. 85, pp. 9764-9770, 2013.

[47] S. M. Berry, A. T. Alarid et D. J. Beebe, «One-step purification of nucleic acid for gene expression analysis via Immiscible Filtration Assisted by Surface Tension (IFAST),» *Lab on a Chip,* vol. 11, pp. 1747-1753, 2011.

[48] A. Suea-Ngam, P. D. Howes, M. Srisa-Art et A. J. deMello, «Droplet microfluidics: from proof-of-concept to real-world utility?,» *Chemical Communications,* vol. 55, pp. 9895-9903, 2019.

[49] H. Song, J. D. Tice et R. F. Ismaligov, «A microfluidic system for controlling reaction networks in time,» *Angewandte Chemie,* vol. 42, pp. 768 -772, 2003.

[50] C. N. Baroud, F. Gallaire et R. Dangla, «Dynamics of microfluidic droplets,» *Lab on a Chip,* vol. 10, pp. 2032-2045, 2010.

[51] X. Casadevall i Solvas et A. deMello, «Droplet microfluidics: recent developments and future applications,» *Chemical Communications,* vol. 47, pp. 1936-1942, 2011.

[52] H. Gu, M. H. G. Duits et F. Mugele, «Droplets formation and merging in two-phase flow microfluidics,» *International Journal of Molecular Science,* vol. 12, pp. 2572-2597, 2011.

[53] S. L. Anna, N. Bontoux et H. A. Stone, «Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels,» *Applied Physics Letters,* vol. 82, pp. 364-366, 2003.

[54] M. Chabert, K. D. Dorfman et J.-L. Viovy, «Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels,» *Electrophoresis,* vol. 26, pp. 3706-3715, 2005.

[55] X. Niu, S. Gulati, J. B. Edel et A. deMello, «Pillar-induced droplet merging in microfluidic circuits,» *Lab on a Chip,* vol. 8, pp. 1837-1841, 2008.

[56] D. R. Link, S. L. Anna, D. A. Weitz et H. A. Stone, «Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices,» *Physical Review Letters,* vol. 92, 2004.

[57] M. Chabert et J.-L. Viovy, «Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells,» *PNAS,* vol. 105, pp. 3191-3196, 2007.

[58] J.-C. Baret, F. Kleinschmidt, A. El Harrak et A. D. Griffiths, «Kinetic aspects of emulsion stabilization by surfactants: a microfluidic analysis,» *Langmuir,* vol. 25, pp. 6088-6093, 2009.

[59] C. D. Eggleton, T.-M. Tsai et K. J. Stebe, «Tip Streaming from a Drop in the Presence of Surfactants,» *Physical Review letters,* vol. 87, 2001.

[60] S. R. Hodges, O. E. Jensen et J. M. Rallison, «The motion of a viscous drop through a cylindrical tube,» *Journal of Fluid Mechanics,* vol. 501, pp. 279-301, 2004.

[61] M. Sesen, T. Alan et A. Neild, «Microfluidic plug steering using surface acoustic waves,» *Lab on a Chip,* vol. 15, pp. 3030-3038, 2015.

[62] C. N. Baroud, M. Robet de Saint Vincent et J.-P. Delville, «An optical toolbox for total control of droplet microfluidics,» *Lab on a Chip,* vol. 7, pp. 1029-1033, 2007.

[63] D. Ferraro, M. Serra, D. Filippi, L. Zago, E. Guglielmin, M. Pierno, S. Descroix, J.-L. Viovy et G. Mistura, «Controlling the distance of highly confined droplets in a capillary by interfacial tension for merging on-demand,» *Lab on a Chip,* vol. 19, pp. 136-146, 2019.

[64] L. Shang, Y. Cheng et Y. Zhao, «Emerging droplet microfluidics,» *Chemical reviews,* vol. 117, pp. 7964-8040, 2017.

[65] H. N. Joensson et H. Andersson Svahn, «Droplet microfluidics—a tool for single-cell analysis,» *Angewandte Chemie,* vol. 51, pp. 12176-12192, 2012.

[66] C. Holtze, A. C. Rowat, J. J. Agresti, J. B. Hutchison, F. E. Angilè, C. H. J. Schmitz, S. Koester, H. Duan, K. J. Humphry, R. A. Scanga, J. S. Johnson, D. Pisignano et D. A. Weitz, «Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions,» *Lab on a Chip,* vol. 8, pp. 1632-1639, 2008.

[67] Y. Fu, C. Li, S. Lu, W. Zhou, F. Tang, X. S. Xie et Y. Huang, «Uniform and accurate single-cell sequencing based on emulsion whole-genome amplification,» *PNAS,* vol. 112, pp. 11923-11928, 2015.

[68] F. Lan, J. R. Haliburton, A. Yuan et A. R. Abate, «Droplet barcoding for massively parallel single-molecule deep sequencing,» *Nature Communications,* vol. 7, 2016.

[69] P. Kumaresan, C. J. Yang, S. A. Cronier, R. G. Blazej et R. A. Mathies, «High-throughput single copy DNA amplification and cell analysis in engineered nanoliter droplets,» *Analytical Chemistry,* vol. 80, pp. 3522-3529, 2008.

[70] Y. Zeng, R. Novak, J. Shuga, M. T. Smith et R. A. Mathies, «High-performance single cell genetic analysis using microfluidic emulsion generator arrays,» *Analytical Chemistry,* vol. 82, pp. 3183-3190, 2010.

[71] Z. Zhu, W. Zhang, X. Leng, M. Zhang, Z. Guan, J. Lu et C. J. Yang, «Highly sensitive and quantitative detection of rare pathogens through agarose droplet microfluidic emulsion PCR at the single-cell level,» *Lab on a Chip,* vol. 12, pp. 3907-3913, 2012.

[72] S. W. Lim, T. M. Tran et A. R. Abate, «PCR-activated cell sorting for cultivation- free enrichment and sequencing of rare microbes,» *PLoS ONE,* vol. 10, 2015.

[73] L. Huang, F. Ma, A. Chapman, S. Lu et X. S. Xie, «Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications,» *Annual Review of Genomics and Human Genetics,* vol. 16, pp. 79-102, 2015.

[74] F. Lan, B. Demaree, N. Ahmed et A. R. Abate, «Single-cell genome sequencing at ultra-high- throughput with microfluidic droplet barcoding,» *Nature Biotechnology,* vol. 35, pp. 640-646, 2017.

[75] N. Andor, B. T. Lau, C. Catalanotti, V. Kumar, A. Sathe, K. Belhocine, T. D. Wheeler, A. D. Price, M. Song, D. Stafford, Z. Bent, L. DeMare, L. Hepler, S. Jett, B. Kengli Lin, S. Maheshwari, A. J. Makarewicz, M. Rahimi, S. S. Sawhney, M. Sauzade, J. Shuga et al, «Joint single cell DNA-Seq and RNA-Seq of gastric cancer reveals subclonal signatures of genomic instability and gene expression,» *bioRxiv,* 2018.

[76] A. Rotem, O. Ram, N. Shoresh, R. A. Sperling, A. Goren, D. A. Weitz et B. E. Bernstein, «Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state,» *Nature Biotechnology,* vol. 33, pp. 1165-1172, 2015.

[77] R. Salomon, D. Kaczorowski, F. Valdes-Mora, R. E. Nordon, A. Neild, N. Farbehi, N. Bartonicek et D. Gallego-Ortega, «Droplet-based single cell RNAseq tools: a practical guide,» *Lab on a Chip,* vol. 19, pp. 1706-1727, 2019.

[78] R. Zilionis, J. Nainys, A. Veres, V. Savova, D. Zemmour, A. M. Klein et L. Mazutis, «Single-cell barcoding and sequencing using droplet microfluidics,» *Nature Protocols,* vol. 12, pp. 44-73, 2017.

[79] L. W. Plasschaert, R. Zilionis, R. Choo-Wing, V. Savova, J. Knehr, G. Roma, A. M. Klein et A. B. Jaffe, «A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte,» *Nature,* vol. 560, pp. 377-381, 2018.

[80] B. Khoramian Tusi, S. L. Wolock, C. Weinreb, Y. Hwang, D. Hidalgo, R. Zilionis, A. Waisman, J. R. Huh, A. M. Klein et M. Socolovsky, «Population snapshots predict early haematopoietic and erythroid hierarchies,» *Nature,* vol. 555, pp. 54-60, 2018.

[81] S. Hrvatin, D. R. Hochbaum, M. A. Nagy, M. Cicconet, K. Robertson, L. Cheadle, R. Zilionis, A. Ratner, R. Borges-Monroy, A. M. Klein, B. L. Sabatini et M. E. Greenberg, «Single-cell analysis of experience-dependent transcriptomic states in the mouse visual cortex,» *Nature Neuroscience,* vol. 21, pp. 120-129, 2018.

[82] G. X. Y. Zheng, J. M. Terry, P. Belgrader, P. Ryvkin, Z. W. Bent, R. Wilson, S. B. Ziraldo, T. D. Wheeler, G. P. McDermott, J. Zhu, M. T. Gregory, J. Shuga, L. Montesclaros, J. G. Underwood, D. A. Masquelier, S. Y. Nishimura, M. Schnall-Levin, P. W. Wyatt et al, «Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells,» *Nature Communications,* vol. 8, 2017.

[83] X. Zhang, T. Li, F. Liu, Y. Chen, J. Yao, Z. Li, Y. Huang et J. Wang, «Comparative analysis of droplet-based ultra-high-throughput single-cell RNA-Seq systems,» *Molecular Cell,* vol. 73, pp. 130-142, 2019.

[84] T. Stuart et R. Satija, «Integrative single- cell analysis,» *Nature Reviews Genetics,* vol. 20, pp. 257-272, 2019.

[85] D. L. DeVoe et C. S. Lee, «Microfluidic technologies for MALDI-MS in proteomics,» *Electrophoresis,* vol. 27, pp. 3559-3568, 2006.

[86] M. Stoeckius, C. Hafemeister, W. Stephenson, B. Houck-Loomis, P. K. Chattopadhyay, H. Swerdlow, R. Satija et P. Smibert, «Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells,» *Nature Methods,* vol. 14, pp. 865-868, 2017.

[87] V. M. Peterson, K. X. Zhang, N. Kumar, J. Wong, L. Li, D. C. Wilson, R. Moore, T. K. McClanahan, S. Sadekova et J. A. Klappenbach, «Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells,» *Nature Biotechnology,* vol. 35, pp. 936-939, 2017.

[88] P. Shahi, S. C. Kim, J. R. Haliburton, Z. J. Gartner et A. R. Abate, «Abseq: Ultrahigh-throughput single cell protein profiling with droplet microfluidic barcoding,» *Scientific Reports,* vol. 7, 2017.

[89] J. M. Granja, S. Klemm, L. M. McGinnis, A. S. Kathiria, A. Mezger, B. Parks, E. Gars, M. Liedtke, G. X. Y. Zheng, H. Y. Chang, R. Majeti et W. J. Greenleaf, «A single cell framework for multi-omic analysis of disease identifies malignant regulatory signatures in mixed phenotype acute leukemia,» *bioRxiv,* 2019.

[90] Y. Zhu et Q. Fang, «Analytical detection techniques for droplet microfluidics-A review,» *Analytica Chimica Acta,* vol. 787, pp. 24-35, 2013.

[91] B. Teste, F. Kanoufi, S. Descroix, P. Poncet, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, J. Petr, A. Varenne et M.-C. Hennion, «Kinetic analyses and performance of a colloidal magnetic nanoparticle based immunoassay dedicated to allergy diagnosis,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* vol. 400, pp. 3395-3407, 2011.

[92] T. Konry, M. Dominguez-Villar, C. Baecher-Allan, D. A. Hafler et M. L. Yarmush, «Droplet-based microfluidic platforms for single T cell secretion analysis of IL-10 cytokine,» *Biosensors ans Bioelectronics,* vol. 26, pp. 2707-2710, 2011.

[93] M. Y. H. Tang et H. C. Shum, «One-step immunoassay of C-reactive protein using droplet microfluidics,» *Lab on Chip,* vol. 16, pp. 4359-4365, 2016.

[94] L. Mazutis, J. Gilbert, W. L. Ung, D. A. Weitz, A. D. Griffiths et J. A. Heyman, «Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics,» *Nature Protocols,* vol. 8, pp. 870-891, 2013.

[95] T. D. Mai, D. Ferraro, N. Aboud, R. Renault, M. Serra, N. T. Tran, J.-L. Viovy, C. Smadja, S. Descroix et M. Taverna, «Single-step immunoassays and microfluidic droplet operation: towards a versatile approach for detection of amyloid-b peptide-based biomarkers of Alzheimer's disease,» *Sensors ans Actuators B : Chemical,* vol. 255, pp. 2126-2135, 2018.

[96] W. Liu et Y. Zhu, «"Development and application of analytical detection techniques for droplet-based microfluidics"- A Review,» *Analytica Chimica Acta,* 2020.

[97] X. Wang, L. Ren, Y. Su, Y. Ji, Y. Liu, C. Li, X. Li, Y. Zhang, W. Wang, Q. Hu, D. Han, J. Xu et B. Ma, «Raman-Activated Droplet Sorting (RADS) for label-free high-throughput screening of microalgal single-cells,» *Analytical Chemistry,* vol. 89, pp. 12569-12577, 2017.

[98] R. Gao, Z. Cheng, X. Wang, L. Yu, Z. Guo, G. Zhao et J. Choo, «Simultaneous immunoassays of dual prostate cancer markers using a SERS- based microdroplet channel,» *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 119, pp. 126-133, 2018.

[99] W. Hale, G. Rossetto, R. Greenhalgh, G. Finch et M. Utz, «High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy in microfluidic droplets,» *Lab on a Chip,* vol. 18, pp. 3018-3024, 2018.

[100] E. Vandermarliere, E. Stes, K. Gevaert et L. Martens, «Resolution of protein structure by mass spectrometry,» *Mass Spectrometry Reviews,* vol. 35, pp. 653-665, 2016.

[101] S. K. Roy, S. Kim, J. H. Yoon, Y.-K. Yoon et K. Cho, «Recent progress on microfluidic electrophoresis device application in mass spectrometry,» *Mass Spectrometry Letters,* vol. 9, pp. 1-16, 2018.

[102] S. Sun et R. T. Kennedy, «Droplet electrospray ionization mass spectrometry for high throughput screening for enzyme inhibitors,» *Analytical Chemistry,* vol. 86, pp. 9309-9314, 2014.

[103] D. J. Steyer et R. T. Kennedy, «High-throughput nanoelectrospray ionization-mass spectrometry analysis of microfluidic droplet samples,» *Analytical Chemistry,* vol. 91, pp. 6645-6651, 2019.

[104] T. Ngernsutivorakul, D. J. Steyer, A. C. Valenta et R. T. Kennedy, «In vivo chemical monitoring at high spatiotemporal resolution using microfabricated sampling probes and droplet-based microfluidics coupled to mass spectrometry,» *Analytical Chemistry,* vol. 90, pp. 10943-10950, 2018.

[105] Y. Su, Y. Zhu et Q. Fang, «A multifunctional microfluidic droplet-array chip for analysis by electrospray ionization mass spectrometry,» *Lab on a Chip,* vol. 13, pp. 1876-1882, 2013.

[106] D.-Q. Jin, Y. Zhu et Q. Fang, «Swan probe: A nanoliter-scale and high-throughput sampling interface for coupling electrospray ionization mass spectrometry with microfluidic droplet array and multiwell plate,» *Analytical Chemistry,* vol. 86, pp. 10796-10803, 2014.

[107] C.-M. Huang, Y. Zhu, D.-Q. Jin, R. T. Kelly et Q. Fang, «Direct surface and droplet microsampling for electrospray ionization mass spectrometry analysis with an integrated dual-probe microfluidic chip,» *Analytical Chemistry,* vol. 89, pp. 9009-9016, 2017.

[108] S. K. Küster, S. R. Fagerer, P. E. Verboket, K. Eyer, K. Jefimovs, R. Zenobi et P. S. Dittrich, «Interfacing droplet microfluidics with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Label-free content analysis of single droplets,» *Analytical Chemistry,* vol. 85, pp. 1285-1289, 2013.

[109] D. Hümmer, S. Bachler, M. Köhler, L. M. Blank, R. Zenobi et P. S. Dittrich, «Microfluidic platform for multimodal analysis of enzyme secretion in nanoliter droplet arrays,» *Analytical Chemistry,* vol. 91, pp. 2066-2073, 2019.

[110] D. Haidas, M. Napiorkowska, S. Schmitt et P. Dittrich, «Parallel sampling of nanoliter droplet arrays for noninvasive protein analysis in discrete yeast cultivations by MALDI-MS,» *Analytical Chemistry,* vol. 92, pp. 3810-3818, 2020.

[111] K. Mesbah, R. Thai, S. Bregant et F. Malloggi, «DMF-MALDI: droplet based microfluidic combined to MALDI- TOF for focused peptide detection,» *Scientific Reports,* vol. 7, 2017.

[112] F. Pereira, X. Niu et A. J. deMello, «A nano LC-MALDI mass spectrometry droplet interface for the analysis of complex protein samples,» *PLoS ONE,* vol. 8, 2013.

[113] X. Feng, B.-F. Liu, J. Li et X. Liu, «Advances in coupling microfluidics chips to mass spectrometry,» *Mass Spectrometry Reviews,* vol. 34, pp. 535-557, 2015.

[114] A. Dodge, E. Brunet, S. Chen, J. Goulpeau, V. Labas, J. Vinh et P. Tabeling, «PDMS-based microfluidics for proteomic analysis,» *Analyst,* vol. 131, pp. 1122-1128, 2006.

[115] J. Ji, L. Nie, L. Qiao, Y. Li, L. Guo, B. Liu, P. Yang et H. H. Girault, «Proteolysis in microfluidic droplets: an approach to interface protein separation and peptide mass spectrometry,» *Lab on a Chip,* vol. 12, pp. 2625-2629, 2012.

[116] K. Meller, M. Szumski et B. Buszewski, «Microfluidic reactors with immobilized enzymes – characterization, dividing, perspectives,» *Sensors and Actuators B,* vol. 244, pp. 84-106, 2017.

[117] J. Lee, H. K. Musyimi, S. A. Soper et K. K. Murray, «Development of an automated digestion and droplet deposition microfluidic chip for MALDI-TOF MS,» *Journal of the American Society for Mass Spectrometry,* vol. 19, pp. 964-972, 2008.

[118] J. Lee, S. A. Soper et K. K. Murray, «Development of an efficient on-chip digestion system for protein analysis using MALDI-TOF MS,» *The Analyst,* vol. 134, pp. 2426-2433, 2009.

[119] B. Wouters, I. Dapic, T. S. E. Valkenburg, S. Wouters, L. Niezen, S. Eeltink, G. L. Corthals et P. J. Schoenmakers, «A cyclic-olefin-copolymer microfluidic immobilized-enzyme reactor for rapid digestion of proteins from dried blood spots,» *Journal of Chromatography A,* vol. 1491, pp. 36-42, 2017.

[120] Z. Wei, P. Fan, Y. Jiao, Y. Wang, Y. Huang et Z. Liu, «Integrated microfluidic chip for on-line proteome analysis with combination of denaturing and rapid digestion of protein,» *Analytica Chimica Acta,* vol. 1102, 2020.

[121] C. Wang, R. Oleschuk, F. Ouchen, J. Li, P. Thibault et D. J. Harrisson, «Integration of immobilized trypsin bead beds for protein digestion within a microfluidic chip incorporating capillary electrophoresis separations and an electrospray mass spectrometry interface,» *Rapid Communications in mass spectrometry,* vol. 14, pp. 1377-1383, 2000.

[122] C. Wang, A. B. Jemere et D. J. Harrison, «Multifunctional protein processing chip with integrated digestion, solid-phase extraction, separation and electrospray,» *Electrophoresis,* vol. 31, pp. 3703-3710, 2010.

[123] A. Kecskemeti et A. Gaspar, «Preparation and characterization of a packed bead immobilized trypsin reactor integrated into a PDMS microfluidic chip for rapid protein digestion,» *Talanta,* vol. 166, pp. 275-283, 2017.

[124] M. Slovakova, N. Minc, Z. Bilkova, C. Smadja, W. Faigle, C. Fütterer, M. Taverna et J.-L. Viovy, «Use of self assembled magnetic beads for on-chip protein digestion,» *Lab on a Chip,* vol. 5, pp. 935-942, 2005.

[125] Z. Bilkova, M. Slovaskova, N. Minc, C. Fütterer, R. Cecal, D. Horak, M. Benes, I. le Potier, J. Krenkova et V. J.-L. Przybylski, «Functionalized magnetic micro- and nanoparticles: Optimization and application to µ-chip tryptic digestion,» *Electrophoresis,* vol. 27, pp. 1811-1824, 2006.

[126] A. Le Nel, N. Minc, C. Smadja, M. Slovakova, Z. Bilkova, J.-M. Peyrin, J.-L. Viovy et M. Taverna, «Controlled proteolysis of normal and pathological prion protein in a microfluidic chip,» *Lab on a Chip,* vol. 8, pp. 294-301, 2008.

[127] J. Bataille, A. Viodé, I. Pereiro, J. P. Lafleur, F. Varenne, S. Descroix, F. Becher, J. P. Kutter, C. Roesch, C. Poüs, M. Taverna, A. Pallandre, C. Smadja et I. Le Potier, «On-a-chip tryptic digestion of transthyretin: a step toward an integrated microfluidic system for the follow-up of familial transthyretin amyloidosis,» *Analyst,* vol. 143, pp. 1077-1086, 2018.

Chapitre 2 - Développement d'un système de microfluidique de gouttes pour la séparation des génomes et transcriptomes de cellules uniques

Dans ce chapitre, je présente un des deux projets sur lesquels j'ai travaillé pendant ma thèse qui porte sur le développement d'un système de microfluidique de gouttes pour la séparation de génome et transcriptome de cellules uniques. Ce projet a été réalisé en collaboration avec Simon Dumas, qui a soutenu sa thèse dans notre laboratoire en décembre 2020, avec qui j'ai eu la chance d'effectuer des expériences en binômes. Je tiens à remercier Aude Batistella, Fanny Cayrac et Fahima Di Federico, de la plateforme BMBC de l'Institut Curie, qui nous ont formés sur les techniques de biologie cellulaire et moléculaire dont nous avions besoin sur ce projet.

Notre but est de fournir de nouveaux outils basés sur la microfluidique de gouttes et l'extraction de particules magnétiques pour l'analyse multi-omique de cellules uniques. Actuellement, très peu de plateformes intégrées permettent plusieurs modes d'analyse de cellules uniques et, à notre connaissance, seulement une technique de microfluidique de gouttes, sans séparation des analytes, permet d'étudier à la fois le transcriptome et le génome accessible de noyaux uniques [1]. Nous pensons que notre technologie de pince magnétique peut être très appropriée pour automatiser et réduire les volumes réactionnels de protocoles existants pour l'analyse multi-omique de cellules uniques et notamment ceux basés sur la séparation physique des biomolécules.

Dans une première partie, je présente la technologie des pinces magnétiques qui a été utilisée pour les expériences décrites dans ce chapitre et dans le chapitre suivant. Une deuxième partie expose le principe de l'expérience ainsi que la méthode retenue pour caractériser l'efficacité et la spécificité de la séparation dans notre système. Ensuite, les résultats obtenus sont présentés par ordre de complexification de l'échantillon de départ : de la solution d'ARN et d'ADN pré-purifiés, au lysat cellulaire puis à l'analyse de quelques cellules entières.

I. Principe et avantages des pinces magnétiques

1. Utilisation de support solide en biologie analytique

L'utilisation de particules solides en suspension dans les protocoles bioanalytiques est une pratique commune pour des essais biologiques standards. Les particules solides sont typiquement employées comme support pour l'extraction d'acides nucléiques et de biomolécules et la manipulation ou détection de cellules [2]. Ces applications exploitent deux avantages principaux des particules solides : premièrement la possibilité de fonctionnaliser leur surface avec une large gamme de protocoles de chimie de surfaces [3], ce qui offre une grande polyvalence dans leurs propriétés de surface vis-à-vis de l'agrégation et de leur adsorption non-spécifique sur des surfaces, cette versatilité permet aussi d'envisager différentes approches pour la liaison de ligands. Un deuxième avantage majeur de ces particules est lié au rapport surface sur volume important, à cause de leur taille micro/nanométrique, ce qui améliore la capture [4].

Ces particules peuvent également avoir des propriétés superparamagnétiques, ce qui présente l'avantage de pouvoir les manipuler à distance avec un champ magnétique externe. La force qui s'exerce sur les particules peut alors être approximée par $F_{mag} \approx \frac{Q}{\rho} M \nabla B$ où Q est la quantité de particules, ρ est leur densité, M est la magnétisation d'une particule et B est le champ magnétique local [5]. De nombreux protocoles de bioanalyse ont été développés dans des versions « sur billes ». Dans ces protocoles, une suspension de billes paramagnétiques fonctionnalisées avec un ligand est mélangée à l'échantillon pour capturer des molécules spécifiquement. Un aimant est ensuite placé proche de la solution pour permettre le retrait de la solution tout en gardant les billes dans le tube initial. Les billes peuvent ensuite être dispersées dans une nouvelle solution pour un lavage ou pour l'étape de détection (Figure 28). Ce protocole est appelé extraction magnétique sur phase solide (MSPE) et est utilisé notamment pour les protocoles à plusieurs étapes comme la méthode immuno-enzymatique d'ELISA [6] ou la purification d'acides nucléiques.

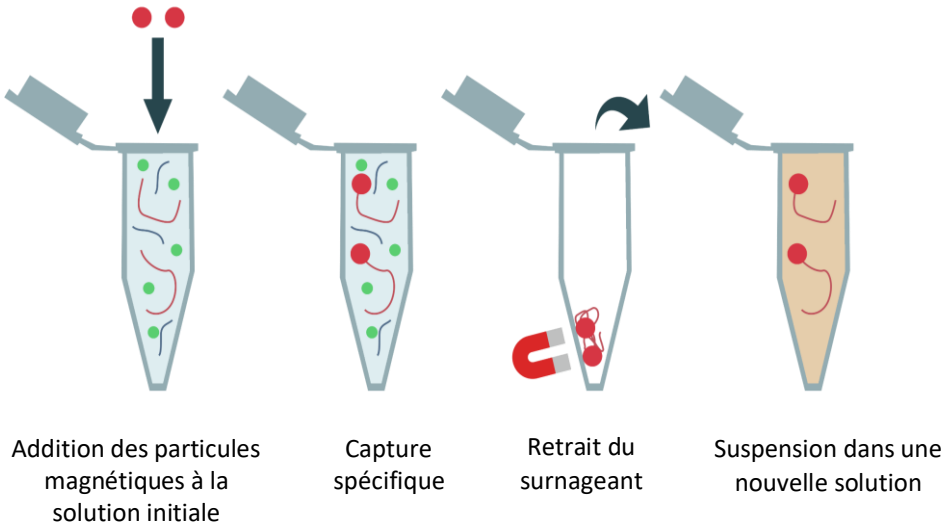


Figure 28 : Principe de l'extraction magnétique sur phase solide

Ce type de protocole est de plus en plus miniaturisé, notamment pour réduire les volumes utilisés et automatiser les processus. L'utilisation de microbilles magnétiques fonctionnalisées dans les protocoles macroscopiques standards permet de transposer en microfluidique de gouttes des étapes de purification et de préconcentration. Cela facilite l'intégration de protocoles biomédicaux complexes et permet d'envisager le développement d'essais cliniques fiables sur des plateformes microfluidiques [7].

2. Utilisation de support solide magnétique en microfluidique de gouttes

i. Les différentes approches

Différentes techniques, passées en revue dans [7], sont utilisées pour intégrer les protocoles de bioanalyse sur billes magnétiques en microfluidique de gouttes. Dans ce paragraphe nous nous focalisons sur les approches en microfluidique de gouttes continue, c'est-à-dire lorsque les gouttes sont transportées par une phase continue, de l'huile, dans des microcanaux.

Une première approche est basée sur la division hydrodynamique de gouttes contenant des particules magnétiques, une des deux gouttes résultantes étant plus concentrée en particules

magnétiques grâce au positionnement d'un aimant à proximité de la puce microfluidique (Figure 29). Cette technique a indépendamment été proposée en 2010 par AlHetlani et al. [8] et Lombardi et Dittrich [9]. Ces derniers ont utilisé cette méthode pour caractériser la liaison entre la warfarine, un agent thérapeutique, et l'albumine de sérum humain, une protéine abondante dans le sang. Les performances de ce système sont prometteuses : le taux de récupération des billes dans la goutte fille est de plus de 95% pour des concentrations de billes comprises entre 1 et 3.3 mg/mL, le volume des gouttes est faible (1.25 nL) et le débit est de 30 gouttes/s. Cependant la séparation symétrique des gouttes limite le taux de purification puisque seulement la moitié de la goutte initiale est enlevée, tandis que l'autre moitié est dans la goutte enrichie en particules.

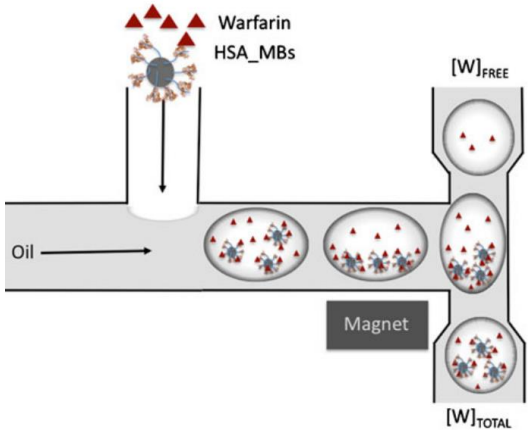


Figure 29 : Schéma de la méthode. Les billes magnétiques fonctionnalisées avec l'albumine et la warfarine sont injectées dans un canal parcouru par de l'huile pour former des microgouttes. Des gouttes filles de volumes identiques sont formées au niveau de la jonction T, l'une étant enrichie en particules magnétiques grâce à un aimant. Source : [9].

D'autres méthodes basées sur le même principe de séparation hydrodynamique ont été proposées pour augmenter le taux de purification et donc avoir un meilleur enrichissement de la goutte fille contenant les billes magnétiques. Par exemple, Pan et al [10] ont développé une puce contenant une séquence d'étapes avec une séparation asymétrique des gouttes et l'addition de réactifs pour purifier de l'ADN du virus hépatite B à partir d'échantillon de sérum. Le fait d'avoir quatre étapes de séparation permet d'améliorer la purification de l'ADN car une partie du surnageant ne contenant pas d'ADN est éliminé à chaque séparation. L'efficacité d'extraction de l'ADN moyenne obtenue avec cette méthode est de 46%. Cependant le taux de purification est toujours une limitation de cette méthode puisqu'après trois lavages successifs la goutte finale contient encore 7% de la solution présente dans la goutte originale. Une stratégie similaire a été exploitée par Gao et al [11] couplée à la spectroscopie de Raman (SERS) pour détecter l'expression

de la protéine PSA. D'autres travaux ont été effectués en utilisant le même principe de division asymétrique : Lee at al [12] ont ajouté un module permettant la fusion de deux gouttes par électro-coalescence pour faire une étape de lavage, Brouzes et al [13] ont optimisé la géométrie de la fourche de séparation des gouttes pour obtenir un taux de capture des billes optimal de 98% à un débit de 15 gouttes/s et Verbruggen et al [14] ont proposé une géométrie qui permet de conserver la résistance hydrodynamique dans les différents canaux et de choisir précisément le volume des gouttes filles grâce une asymétrie créée par une arrivée d'huile du côté de la goutte enrichie en billes magnétiques. Ce dernier système a permis d'améliorer les performances d'extraction et purification, et les paramètres de séparation de la goutte peuvent être choisis en fonction de l'application en cherchant un compromis entre l'efficacité de capture et le taux de purification. Dans tous les systèmes évoqués, la redispersion des billes magnétiques dans une nouvelle goutte nécessite une étape de coalescence entre ces deux gouttes. Nous avons évoqué dans le premier chapitre différentes méthodes pour la fusion de gouttes couramment utilisées, mais contrôler le contact entre deux gouttes à fusionner nécessite une synchronisation et des circuits de microcanaux additionnels ce qui complexifie la puce. De fait, des protocoles biologiques typiques, comme des étapes de rinçage ou des immunoessais peuvent être compliqués à intégrer.

Une autre approche, qui est celle exploitée dans le système que j'ai utilisé, est basée sur une extraction magnétique directe des particules. La séparation n'est plus induite par la scission de la goutte initiale à la jonction entre deux canaux mais par l'équilibre entre la force de trainée visqueuse qui pousse la goutte à avancer dans le canal, les forces capillaires qui tendent à garder la goutte entière et la force magnétique qui retient un agrégat de particules magnétiques (aussi appelé « cluster »). En particulier, dans le référentiel de la goutte en mouvement, une extraction des billes magnétiques est possible à l'approche d'un aimant si la force magnétique est plus importante que les forces interfaciales, elles-mêmes dominées par la force de trainée visqueuse de la goutte principale. Gu et al [15] ont appliqué cette idée pour réaliser une extraction sur phase solide comportant plusieurs étapes pour la purification d'ADN de cellules uniques dans des gouttes d'une centaine de picolitres. Cette stratégie permet un taux d'enrichissement très élevé comparée aux autres techniques car la deuxième goutte créée par l'extraction contient l'agrégat de particules magnétiques et seulement une faible quantité de solution initiale. Cependant, un inconvénient de ce système est qu'il n'est pas possible de capturer et relarguer successivement les billes dans des gouttes, ce qui peut être limitant pour certains protocoles. Le système de pinces magnétiques, développé dans notre laboratoire, permet de surmonter cette limitation en activant ou désactivant à souhait le champ magnétique qui créé la force magnétique. Récemment, Metzler et al [16] ont aussi présenté un système qui utilise l'activation séquentielle de la force magnétique en déplaçant un aimant permanent et qui permet d'extraire de très faibles quantités de particules

magnétiques en jouant sur la forme du ménisque lorsque le goutte traverse une zone où le canal est hydrophile. L'inconvénient majeur de ce type de système est la perte du film de lubrification entre la goutte et le canal, ce qui peut entrainer des contaminations entre gouttes.

L'extraction magnétique de particules solides en gouttes a aussi été réalisée en microfluidique digitale (DMF), qui permet le contrôle indépendant de gouttes aqueuses, créées dans de l'huile ou l'air, et placées sur une surface solide. Dans ces systèmes, le mouvement des gouttes est généralement contrôlé par électromouillage sur diélectrique (electrowetting on dielectric, EWOD) : l'angle de contact entre une goutte et la surface solide est modifié électriquement, provoquant un changement asymétrique de la tension de surface de la goutte et donc un gradient de pression à l'intérieur de la goutte qui suscite son déplacement. L'extraction magnétique de particules avec ce type de système a été réalisée en 2008 par Fouillet et al [17], où un aimant permanent est fixé sous la puce pour créer un agrégat compact de billes magnétiques. Lorsque la goutte est déplacée, elle est étirée sous l'action de la force magnétique et des forces d'électromouillage, et si celles-ci sont équivalentes et plus importantes que les forces capillaires, la goutte se sépare et l'agrégat de particules est extrait de la goutte initiale (Figure 30).

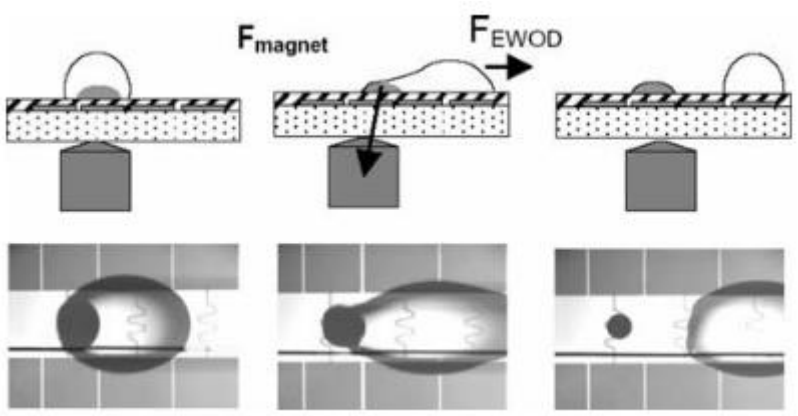


Figure 30 : Extraction de billes magnétiques en microfluidique digitale. Le volume de la goutte est de 1µL et celui de l'agrégat extrait est d'environ 10 nL. [17]

Le potentiel du couplage entre la microfluidique digitale et l'extraction de particules magnétiques a ensuite été montré sur plusieurs applications bioanalytiques et cette approche a été optimisée par différents groupes [18] [19]. Par exemple, cette approche a été utilisée pour réaliser des immunoessais en gouttes pour la détection d'agents pathogènes [20] ainsi que pour la manipulation d'acides nucléiques, comme la purification et l'amplification d'ARNm sur une seule puce à partir de quelques cellules [21] et la préparation de librairies d'ADN pour le

séquençage nouvelle génération [22]. Ces applications démontrent la versatilité de cette technologie, qui permet d'atteindre des taux d'extraction et de purification comparables à ceux obtenus par des méthodes macroscopiques conventionnelles, tour en réduisant les volumes et en augmentant l'automatisation. Des limitations de cette technologie sont la complexité de la microfabrication et la difficulté de contrôler des volumes très petits (pL). La microfluidique de gouttes continue permet parfois de mieux surmonter ces limitations.

ii. Les pinces magnétiques

La technologie des pinces magnétiques a été implémentée dans notre équipe en 2012 pendant la thèse d'Anaïs Ali-Cherif [5]. Le principe d'extraction des billes magnétiques repose sur le même équilibre des forces décrit précédemment mais la force magnétique peut être séquentiellement activée ou désactivée par la génération du champ magnétique. En effet, le champ magnétique est créé par le courant parcourant une bobine et est focalisé proche du capillaire dans lequel passent les gouttes grâce à une pointe en permalloy (un alliage de nickel et de fer). A l'approche d'une goutte contenant les particules magnétiques, le courant est allumé et les billes se regroupent pour former un agrégat (ou cluster) compact qui est extrait de la goutte mère. Cet agrégat est contenu dans une sous-goutte aqueuse, donc n'est jamais en contact avec l'huile ou les parois du tube. De plus, le volume de cette sous-goutte est d'environ 1nL, ce qui est permet une extraction très efficace en comparaison du volume de la goutte initiale qui est de 100 ou 200 nL. Lorsqu'une deuxième goutte fusionne avec l'agrégat, le courant générant le champ magnétique peut être éteint afin de relarguer les billes dans cette goutte (Figure 31). Cette fusion passive est possible car, contrairement aux systèmes conventionnels de microfluidique de gouttes où les tensioactifs sont utilisés pour empêcher les gouttes de coalescer, le perfluorodecanol (PFD) est utilisé ici pour créer une émulsion stable dans un état confiné et ne bloque pas la coalescence de deux gouttes lorsqu'elles entrent en contact. Plusieurs étapes d'extraction et redispersion peuvent ainsi être faites séquentiellement, ce qui permet d'effectuer des bioessais complexes.

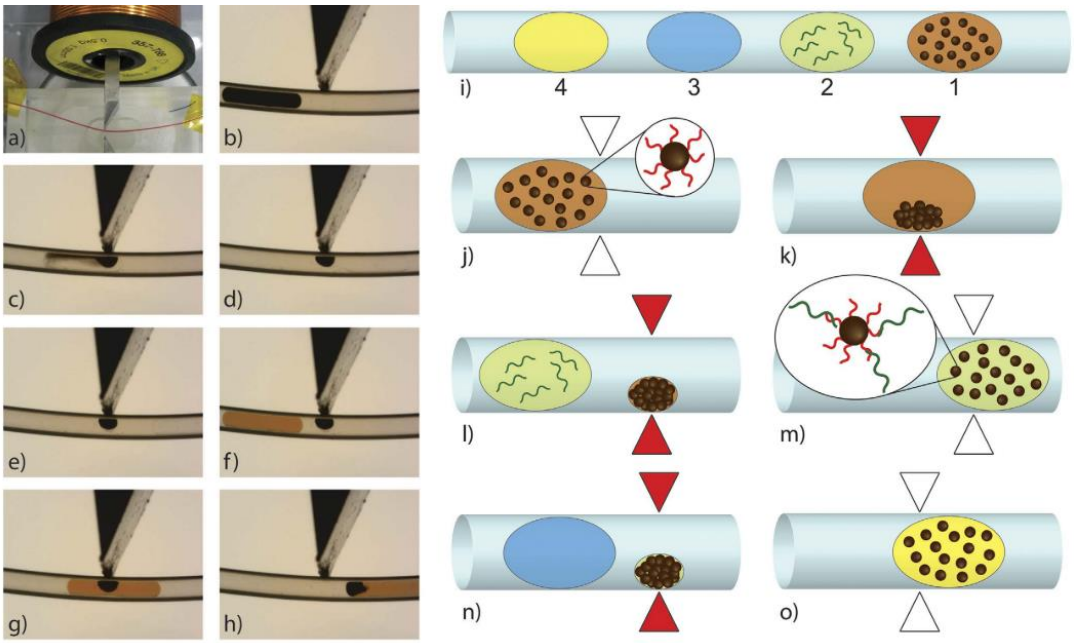


Figure 31 : a) Photos de la pointe en permalloy placée dans la bobine et proche du capillaire. b) à h) séquence d'extraction et redispersion de billes magnétiques en gouttes. i) à o) exemple d'essai réalisé avec les pinces magnétiques. Composition des gouttes : 1) billes magnétiques fonctionnalisées polyT, 2) échantillon contenant l'ARNm, 3) solution de lavage, 4) solution de RT-PCR. Cette séquence permet de purifier l'ARNm et de le rétrotranscrire de manière automatisée. Source : [23]

Pendant sa thèse [24], Anaïs Ali-Cherif a développé le système « macroscopique » avec les pointes en permalloy qui focalisent le champ magnétique créé par une bobine. Elle a caractérisé le système en déterminant les conditions expérimentales nécessaires pour l'extraction, c'est à dire lorsque les forces magnétiques F_{mag} sont supérieures aux forces interfaciales F_{int}. Un diagramme de phase (Figure 32 a) représente le comportement des gouttes de 100 nL contenant des quantités de particules allant de 0.1 µg à 1 µg, pour différentes valeurs de courant électrique parcourant la bobine. Deux régimes peuvent être distingués : un régime où la goutte se casse et le cluster est extrait, qui correspond aux conditions où $F_{mag} > F_{int}$, et un régime où la goutte reste intègre et les billes ne sont pas extraites, correspondant à $F_{mag} < F_{int}$. Ces régimes ont aussi été identifiés pour une quantité fixée de particules magnétiques (1 µg) en faisant varier le débit dans le capillaire et le courant traversant la bobine (Figure 32 b). Sur la gamme de débit représentée (0.01 à 0.07 µL/s), la vitesse des gouttes n'a pas une forte influence sur le régime de capture. A haut débit, lorsque le temps de formation de l'agrégat est comparable au temps de résidence de la goutte proche des pointes magnétiques, la vitesse des gouttes définit une limite haute du temps pour que les billes magnétiques s'agrègent, ce qui influence les performances d'extraction. En particulier, une extraction partielle ou un échec du piégeage des particules magnétiques peut arriver à haut débit, ou lorsque la viscosité de la goutte est importante, ce qui augmente le temps nécessaire à la formation de l'agrégat.

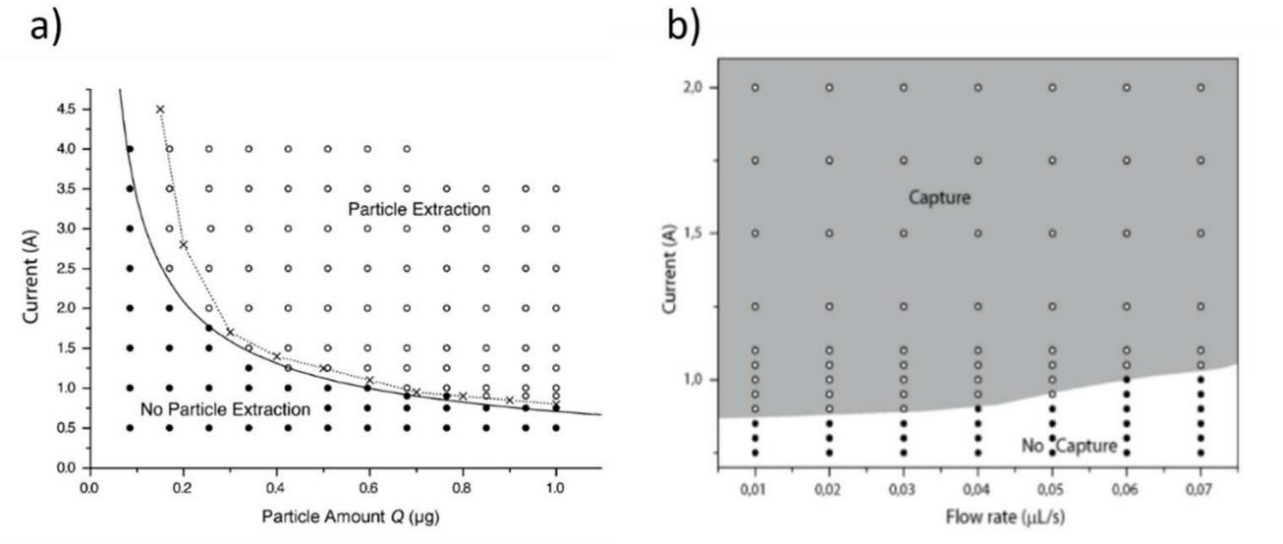


Figure 32 : Diagrammes de phase des conditions d'extraction pour différentes valeurs du courant électrique parcourant la bobine en fonction de (a) la quantité de particules en goutte et (b) le flux dans le capillaire. Les conditions pour lesquelles les billes sont extraites sont représentés par des cercles vides et celles pour lesquelles les billes ne sont pas extraites sont représentées par des cercles pleins. [24]

Pendant ce travail de caractérisation et d'optimisation, des simulations numériques ont montré que la présence d'une deuxième pointe en permalloy en vis-à-vis de la première permet de mieux focaliser les lignes de champ et donc augmente la force magnétique au niveau des pointes pour des meilleures performances d'extraction.

Ce système de pinces magnétiques a démontré son potentiel en permettant de réaliser en goutte un dosage de biomarqueurs par ELISA [5], un essai d'immuno-agglutination [25], l'immunoprécipitation de chromatine [26], la purification et amplification d'ARNm [23] et un ELISA pour la détection de biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer [27]. C'est ce système de pinces magnétiques que j'ai utilisé pendant ma thèse et nous nous sommes appuyés sur les bioessais réalisés précédemment pour créer le protocole expérimental décrit dans ce chapitre.

Une deuxième génération de pince magnétique a été développée et caractérisée pendant la thèse de Marco Serra [28]. Le système de pince magnétique a été miniaturisé et intégré sur puce, et son positionnement est tel que le flux d'huile applique un cisaillement qui favorise la scission de la goutte et l'extraction du cluster (Figure 33 d). La force magnétique est générée par deux composants magnétiques doux microfabriqués dans une puce en PDMS qui focalisent le champ magnétique créé par un aimant permanent externe. Cet aimant peut être déplacé pour activer ou désactiver le champ focalisé dans la puce. Ce système a notamment été utilisé pour la purification d'ARNm à partir d'ARN total comme preuve de concept [29] et pour la préparation de librairies pour le séquençage de nouvelle génération [30].

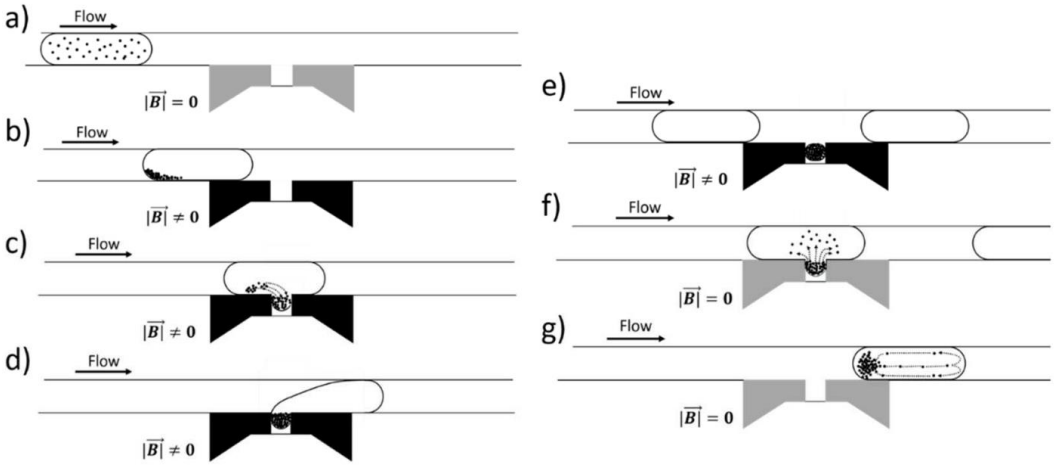


Figure 33 : Schéma de l'extraction magnétique avec la configuration comportant les éléments magnétiques doux intégrés dans une puce en PDMS. [28]

Enfin, Simon Dumas a développé une troisième génération de pinces magnétiques pendant sa thèse [31]. Cette fois les aimants sont microfabriqués sur la puce par électrodéposition, ce qui augmente l'intensité de la force magnétique que peut générer le système et donc permet de réduire la quantité de particules nécessaire à l'extraction des billes magnétiques. Les tailles de gouttes générées ont donc pu être réduites et sont de l'ordre de 100pL (100nL dans les deux premières générations). La réduction de taille du système permet d'augmenter le débit et d'atteindre des performances comparables à ce qui est obtenu en microfluidique de gouttes dans les systèmes classiques. Ce système, très prometteur pour l'intégration et l'automatisation de l'extraction magnétique en microfluidique de gouttes, est encore en cours de développement par Simon.

iii. Caractéristiques du système de pinces utilisé

Pour les expériences présentées dans cette thèse, nous avons utilisé les pinces magnétiques « macroscopiques » de première génération. La pince est composée de deux pointes en permalloy (ferromagnétique doux, AFK502 alloy, de Aperam) dont une est placée dans une bobine (environ 1000 tours de fil de cuivre de diamètre 1mm) alimentée en courant 1A par un générateur de puissance (Velleman) contrôlé manuellement et l'autre est placée en vis-à-vis pour guider les lignes de champ. Le champ magnétique atteint est de l'ordre de 0.35T entre les pointes avec un gradient de 500 $T.m^{-1}$. Pour l'observation des gouttes, un objectif macro (Computar, MLH-10X) est monté sur une caméra CMOS (acA1300-60 gm, Basler) et une LED produit l'illumination par-dessous (Schott Lighting and Imaging).

II. Conception de l'expérience en gouttes

1. Principe général

L'objectif de l'expérience que nous avons implémentée en goutte est de séparer l'ADNg (ADN génomique) et l'ARNm (ARN messager) d'une cellule. En effet, comme décrit au Chapitre 1, l'étude des génomes et transcriptomes de cellules uniques permet de révéler l'étendu et le rôle de l'hétérogénéité cellulaire qui apparait dans les organismes sains ou pathologiques. L'accès à l'information génomique et l'information transcriptomique d'une même cellule permet de les corréler et de mieux comprendre la régulation de l'identité et du phénotype cellulaire [32].

L'intérêt de la séparation physique du matériel génomique et transcriptomique est de pouvoir les analyser indépendamment ensuite avec un protocole optimisé pour chacun, par exemple une transcription inverse et la préparation de librairies pour le séquençage de l'ARNm et une amplification du génome entier (ici aussi il faut préparer les librairies) suivi du séquençage pour l'ADNg [33].

Un protocole existant qui a retenu notre attention est le G&T-seq [34] (décrit dans le Chapitre I). Ce protocole est basé sur la capture et la séparation sur billes magnétiques de l'ADNg et l'ARNm du reste de la cellule. Cependant il est limité à un format de plaques multi-puits et demande la réalisation de nombreuses opérations manuelles délicates. Par exemple, à cause de la faible quantité de matériel génomique et transcriptomique dans une cellule unique, les cônes de pipettes doivent être rincés plusieurs fois pour ne pas perdre de matériel et le pipetage du surnageant lors de la séparation doit être précis. Nous pensons que la plateforme des pinces magnétiques peut être très pertinente pour automatiser et réduire les volumes de réactions de protocole comme G&T-seq.

Le principe du protocole que nous avons transféré en goutte est représenté sur la Figure 34. Une première étape consiste à encapsuler une cellule unique puis la lyser en goutte. Cette première étape n'a pas encore été effectuée sur une cellule unique dans les expériences décrites dans la suite car nous avons d'abord cherché à effectuer les extractions sur des échantillons de plus en plus complexes pour arriver à quelques cellules présentes dans la goutte initiale. Ensuite, des billes magnétiques fonctionnalisées avec des séquences poly-T (ou « Oligo(dT) ») sont utilisées pour capturer l'ARNm et l'extraire spécifiquement. Puis, des billes magnétiques qui servent de support pour la capture de l'ADNg sont ajoutés dans le surnageant. Enfin, lorsque l'ADN

est extrait de la goutte précédente, on espère obtenir trois gouttes contenant théoriquement : l'ARNm purifié, l'ADNg purifié et le reste du lysat cellulaire (protéines, lipides…). Ces trois gouttes devraient ensuite pouvoir être récupérées et analysées indépendamment.

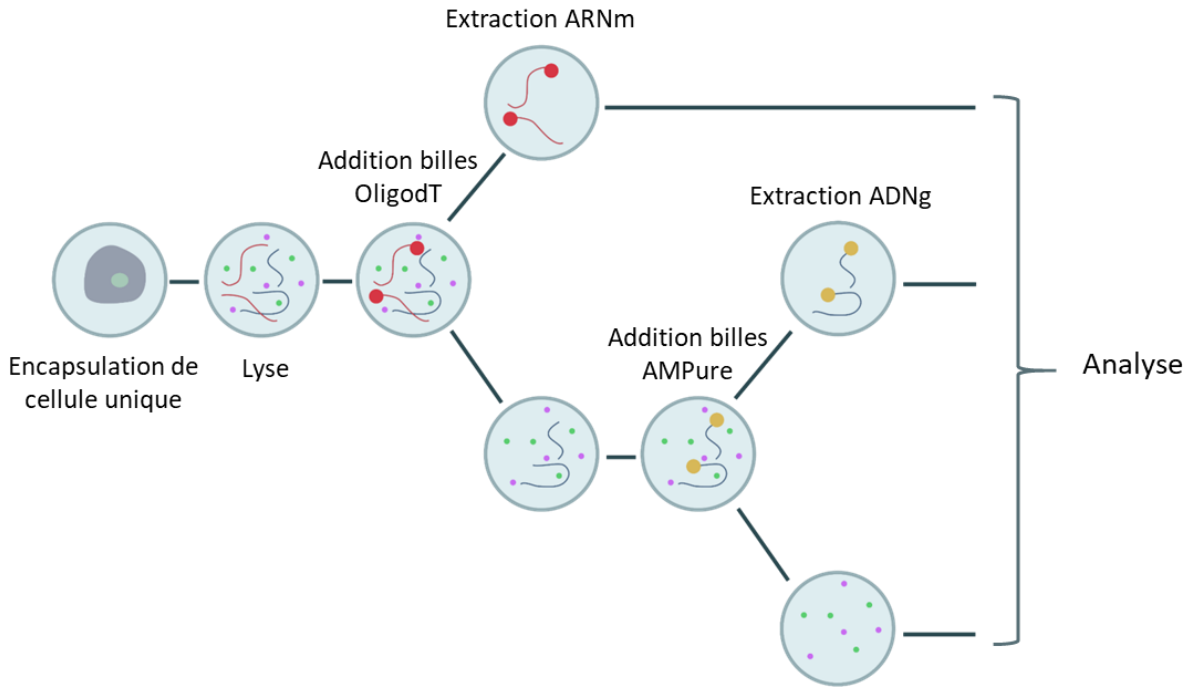


Figure 34 : Principe de l'expérience de séparation d'ADN et d'ARNm en goutte.

2. La séparation physique

Pour la capture de l'ARNm, nous avons travaillé avec les billes Dynabeads Oligo(dT)$_{25}$ (de Thermofisher). Ces billes de 1µm de diamètre sont très spécifiques à l'ARNm car elles se lient aux brins d'ARNm par leur queue poly-A. La solution de capture doit être de la composition indiquée dans le guide d'utilisation : 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM LiCl et 1 mM EDTA pour l'extraction à partir d'ARN pré-purifié et 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS et 5 mM DTT pour l'extraction à partir de lysat cellulaire.

Dans le choix du protocole d'extraction pour l'ADNg, un critère rédhibitoire est la compatibilité avec la solution tampon, imposée par l'extraction de l'ARNm, dans laquelle se trouve l'échantillon. Comme dans le protocole G&T-seq, nous avons utilisé les billes AMPure XP de

Agencourt pour extraire l'ADNg. Ces billes sont en général utilisées dans les protocoles de purification et sélection de taille post amplification de l'ADN pour la préparation de librairie pour le séquençage. Ce protocole repose sur la méthode d'immobilisation réversible sur phase solide (SPRI), dans laquelle des particules magnétiques recouvertes de groupements carboxyle peuvent capturer de manière réversible des brins d'ADN sous certaines conditions de concentrations de sels et polyéthylène glycol (PEG-8000). L'ADN étant une molécule polaire, elle est solvatée dans l'eau. Les cations de sodium présents dans la solution tampon servent d'écran entre la charge négative de l'ADN et les fonctions carboxylate à la surface des billes. Dans ces conditions, les billes ne sont plus répulsives pour l'ADN. Avec l'ajout de PEG, l'ADN subit un changement de structure résultant en un enroulement compact. Quand une molécule hydrophile comme le PEG est ajoutée à la solution avec une concentration spécifique en sel Na^+, l'ADN s'agrège et précipite sur les billes présentes en solution. L'ADN ainsi capturé peut être ensuite élué dans une solution aqueuse dépourvue de PEG et de NaCl. Ce protocole est utilisé notamment pour la sélection en taille de brins d'ADN car le choix de la concentration en PEG et NaCl influence la taille des brins d'ADN adsorbés à la surface des billes. En particulier, augmenter la concentration en PEG et NaCl permet de capturer des plus petits fragments d'ADN [30]. Dans notre expérience, nous cherchons à capturer sur ces billes tout l'ADNg, qui présente des brins très longs. Nous avons donc choisi d'appliquer le ratio 1/1 pour échantillon/solution de billes contenant PEG et NaCl. La solution AMPure XP utilisée contient les billes magnétiques (de diamètre 1µm) chargées négativement dispersées dans une solution composée de 20% (w/v) de PEG-8000 et 2.5M de NaCl. Enfin, comme ces billes ne sont pas spécifiques à l'ADN mais peuvent capturer tout type d'acide nucléique, comme l'ARN, elles sont utilisées après les billes Oligo(dT) qui elles sont bien spécifiques à l'ARNm.

3. Caractérisation des performances de la méthode

i. Principe de la qPCR

Pour caractériser les performances de notre méthode pour isoler spécifiquement l'ARNm et l'ADNg du reste des composants cellulaires, nous devons arriver à quantifier de manière spécifique l'ARNm et l'ADNg présents dans chacune des trois solutions obtenues. Pour cela, nous avons effectué des essais de qPCR (quantitative polymerase chain reaction), après avoir rétrotranscrit (RT) l'ARNm en ADNc (ADN complémentaire). La PCR est une méthode qui permet d'amplifier une séquence d'ADN choisie en répétant des cycles de température. Pour cela il faut deux amorces (primers) [35] qui sont des simple brins d'une vingtaine de nucléotides qui encadrent la séquence à amplifier, et une enzyme polymérase qui construit le brin complémentaire de la séquence à amplifier avec les nucléotides présents dans la solution. Pour mesurer la concentration initiale en ADN, il est possible de suivre l'amplification par mesure de fluorescence. Cette mesure de l'intensité de fluorescence à chaque cycle d'amplification permet de définir un « cycle threshold » (Ct) à partir duquel l'augmentation de la fluorescence devient exponentielle. Une courbe de calibration de Ct en fonction de la concentration initiale en ADN permet de trouver la concentration d'un échantillon en mesurant son Ct. En particulier, plus le Ct est grand, plus la quantité de matériel à amplifier initiale est réduite. Nous avons utilisé deux méthodes différentes pour suivre l'amplification par fluorescence :

- Le SYBR Green I est une molécule qui se lie à l'ADN double brins et fluoresce une fois fixée. L'intensité de fluorescence est donc directement corrélée à la concentration en ADN, qui augmente au fur et à mesure de l'amplification. Nous avons utilisé le SYBR Green qPCR de Sigma (KiCqStart, ReadyMix).
- Les sondes TaqMan sont des simples brins d'une vingtaine de nucléotides dont la séquence correspond à une partie de la séquence à amplifier, auxquels sont attachés un fluorophore et un extincteur (quencher). Lors de l'amplification et du passage de la polymérase sur la séquence où se situe la sonde, celle-ci est hydrolysée et libère le fluorophore qui n'est alors plus éteint (Figure 35). Ainsi à chaque copie effectuée de la séquence à amplifier, l'intensité de fluorescence augmente. L'avantage majeur de cette technique par rapport au SYBR Green est la spécificité : la fluorescence émise correspond à l'amplification de la séquence spécifique choisie. Son inconvénient est que ce type d'essai est un peu plus compliqué et coûteux à mettre en œuvre car il faut créer la sonde avec une séquence bien choisie en plus des amorces.

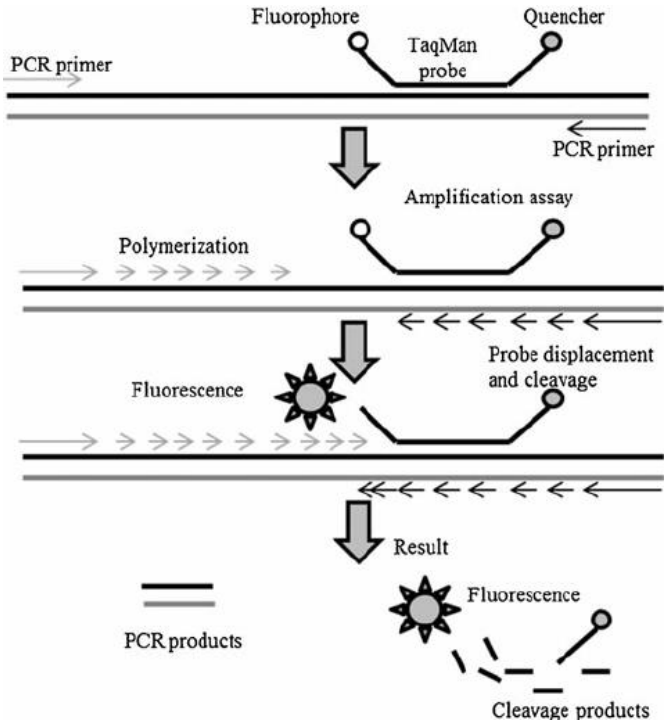


Figure 35 : Principe de la sonde TaqMan. Dans un premier temps les amorces (primers) et la sonde (probe) se fixent sur les simples brins par complémentarité des bases. Lors de la polymérisation, la sonde est hydrolysée et la fluorescence est alors libérée. Source [36]

Pour nos expériences, les sondes et amorces ont été achetée chez Integrated DNA Technologies (IDT) et créées avec le logiciel PrimerQuest tool proposé sur leur site. A partir d'une séquence donnée, choisie sur la base de donnée Ensembl.org, PrimerQuest propose différentes combinaisons d'amorces et sondes qui pourrait fonctionner pour la PCR, avec un ratio de nucléotides GC, une longueur d'amplicon et une température de fusion optimisés.

Les essais de qPCR ont été effectués avec une machine QuantStudio 3 (Applied Biosystems). Après la réaction, les données ont été analysées avec le logiciel de QuantStudio.

ii. Essai de multiplexage

Pour caractériser l'efficacité de la séparation en goutte, nous voulons connaitre à la fois la concentration en ARNm et celle en ADNg présents dans chaque goutte. Cela nous permet de vérifier, par exemple, que la goutte qui contient les billes Oligo(dT) à la fin de l'expérience est bien celle dans laquelle se trouve la majorité de l'ARNm et que la concentration en ARNm dans les autres gouttes est minime. Pour quantifier simultanément l'ADNg et l'ARNm, nous avons voulu prendre parti de la spécificité offerte par les sondes TaqMan en créant deux sondes : une

spécifique à l'ARNm et une autre à l'ADNg. En choisissant des fluorophores de longueurs d'onde différentes, nous pouvons ainsi espérer, à partir d'une même solution, multiplexer chaque réaction de qPCR et obtenir les deux informations voulues.

Pour être amplifié par qPCR, l'ARNm doit être rétro-transcrit en ADNc (ADN complémentaire). Le défi pour le multiplexage est donc de créer des sondes dont la séquence est présente exclusivement sur l'ADNc ou l'ADNg respectivement. L'étape de l'épissage pendant la transcription de l'ADNg en ARNm pourrait induire ce type de séquence. En effet, lors de l'épissage, les séquences dites introniques des ARN pré-messagers sont éliminées de l'ARNm correspondant et ne se retrouvent donc pas sur l'ADNc. Les séquences qui restent sur l'ARNm sont appelées exons. Notre idée a alors été de mettre une sonde à cheval entre deux exons pour obtenir une spécificité à l'ADNc, ce qui est une technique rencontrée dans la littérature [37], et de mettre une sonde sur une séquence intronique pour une spécificité à l'ADNg (Figure 36).

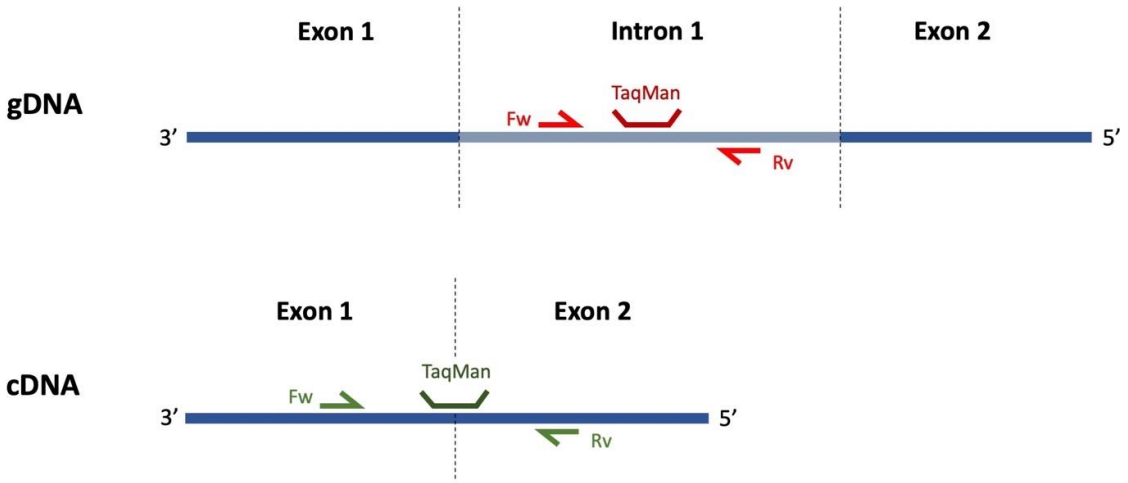


Figure 36 : Principe de l'essai de multiplexage.

Nous avons sélectionné les séquences amorces et sondes sur le gène de ménage humain GAPDH. L'intron choisi est assez long (1632 paires de bases) pour qu'il ne soit pas amplifié en partant des amorces de l'ADNc. Les introns peuvent parfois être retenus sur l'ARNm, c'est un phénomène bien décrit appelé « rétention d'intron », et ces régions sont rapportées sur Ensembl.org donc nous avons choisi la sonde en dehors de ces régions. Les séquences sélectionnées sont rapportées en Annexe 1.

Les échantillons utilisés pour les premiers essais d'extraction sélective d'ARNm et d'ADNg ont été réalisées à partir d'un mélange d'ADN et d'ARN purifiés. Ils ont été obtenus par extraction à partir de lignée de cellules humaines de cancer du sein (lignée cellulaire MDA MB 231) en utilisant des kits d'extraction sur colonnes : NucleoSpin (Macherey-Nagel) pour l'ADN et RNeasy Mini Kit (Qiagen) pour l'ARN. Les échantillons purifiés ont été analysés avec les spectrophotomètres NanoDrop (Themofisher) et Qubit (Thermofisher) pour quantifier le produit obtenu. L'avantage du Nanodrop est qu'il détecte la présence ou non de contaminants dans l'échantillon par mesure d'absorbance UV, néanmoins il ne permet pas de discriminer correctement l'ARN de l'ADN lors de la mesure de l'absorbance. C'est pourquoi nous utilisons aussi le Qubit qui permet de quantifier exclusivement l'ADN ou l'ARN avec des marqueurs fluorescents qui se lient spécifiquement à l'ADN ou l'ARN. [38]

Dans un premier temps, afin de réaliser une courbe de calibration liant les Ct mesurés à la concentration en ARN et en ADN initialement présent dans l'échantillon, nous avons effectué une RT-qPCR (avec le kit CellsDirect, SuperScript III RT/Platinium Taq Mix de Invitrogen) sur des échantillons d'ARN et d'ADN à différentes concentrations connues. Ces essais ont été faits d'abord avec chaque sonde séparément (singleplex) puis avec les deux sondes dans le même mélange réactionnel (multiplex). Nous avons obtenu des valeurs de Ct semblables dans les deux cas, ce qui montre que la présence des deux sondes dans le mélange ne modifie ni l'amplification ni le signal détecté (Figure 37). Tous les contrôles négatifs, dans lesquels l'échantillon est remplacé par de l'eau purifiée, étaient exempts de signal d'amplification.

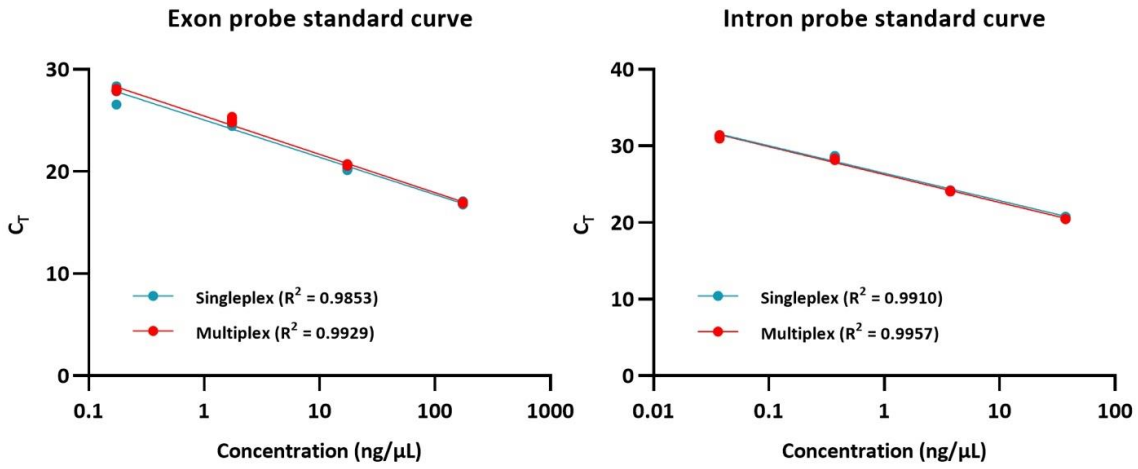


Figure 37 : Courbes de calibration pour la sonde qui cible l'ARNm (exon probe) et celle qui cible l'ADNg (intron probe).

Nous avons ensuite voulu vérifier la spécificité de la sonde intronique à l'ADNg. Pour cela, nous avons réalisé l'essai avec cette sonde sur deux échantillons contenant un mélange d'ADN et d'ARN purifiés à partir de cellules : sans et avec un traitement à la RNase. Nous avons utilisé de la RNase A, qui est une enzyme qui dégrade l'ARN mais garde l'ADN intact. L'échantillon traité est donc supposé contenir uniquement de l'ADN alors que le non-traité contient à la fois ADN et ARN. Si la sonde est spécifique à l'ADNg, elle ne devrait pas se fixer sur l'ADNc donc le Ct devrait être le même avec et sans ARN. Une expérience contrôle, sans rétrotranscription (RT) et avec le kit de SYBR Green à la place de la sonde intronique, a été réalisée pour vérifier que l'ADNg n'était pas dégradé par le traitement à la RNase. Les résultats sont montrés sur la Figure 38a (histogramme vert) pour un échantillon contenant 40ng/µL d'ADN et 160 ng/µL d'ARN. Nous voyons que dans le contrôle au SYBR Green, il n'y pas de différence significative entre les échantillons traités ou non à la RNase, ce qui signifie que l'ADNg n'a pas été dégradé par le traitement à la RNase. Par contre, lorsque la sonde intronique est utilisée (Figure 35a histogramme orange), on obtient un Ct beaucoup plus haut dans l'échantillon traité à la RNase, ce qui signifie qu'il y a une quantité de séquence intronique plus élevée dans l'échantillon contenant de l'ARN, et donc que cette sonde, voulue spécifique à l'ADNg, peut aussi s'attacher à l'ADNc.

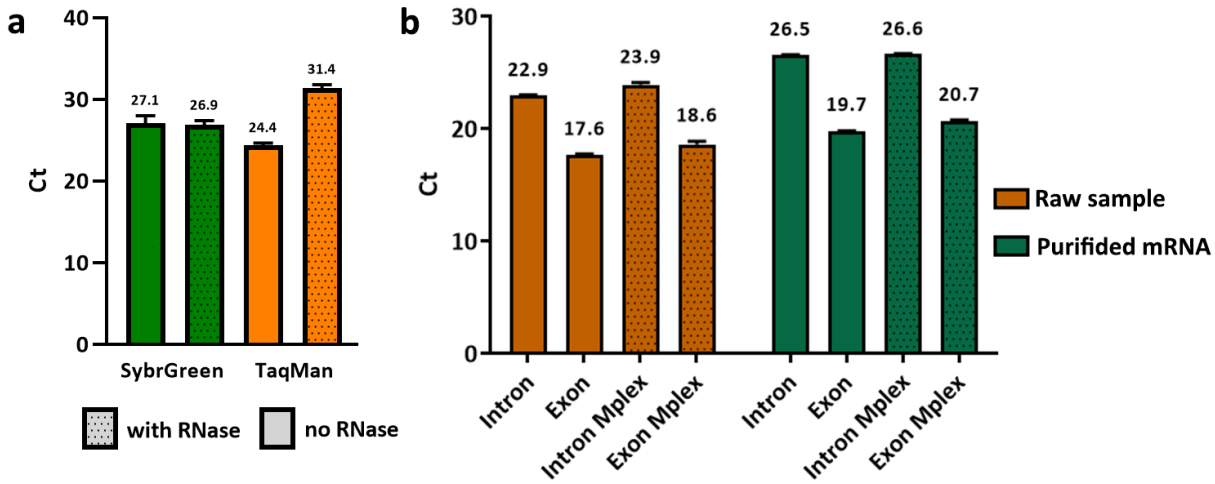


Figure 38 : a. Test de la sonde intronique sur un échantillon soumis ou non à un traitement à la RNase. b. Test de l'essai en multiplex et en singleplex sur un échantillon contenant l'ARN et l'ADN totales et sur un échantillon contenant uniquement l'ARNm.

Ces essais ont été effectués sur de l'ARN total, or l'ARNm, qui est l'ARN extrait par les billes Oligo(dT), ne représente que 1 à 5% de l'ARN total présent dans une cellule. Nous avons donc décidé de réaliser l'essai sur l'ARNm isolé dans l'espoir de sélectionner un ARNm plus mature et qui a bien subit l'épissage. Pour isoler l'ARNm, nous avons utilisé le kit contenant les billes

magnétiques Dynabeads Oligo(dT)$_{25}$. Nous avons ensuite réalisé l'essai de RT-qPCR en singleplex et multiplex sur l'échantillon de base et l'échantillon où l'ARNm est purifié (Figure 38b). Nous observons que même avec l'ARNm purifié, le Ct obtenu avec la sonde intronique est proche de 26.5 alors qu'avec la purification nous attendions un Ct beaucoup plus haut (supérieur à 30) si les séquences introniques avaient été totalement éliminées. Nous avons vérifié que cette amplification ne provient pas de l'ADNg en effectuant un contrôle sans RT avec le SYBR Green sur l'échantillon purifié d'ARNm. Nous avons obtenu un Ct de 24 sur l'échantillon de base et de 34 sur l'échantillon purifié. Cette dernière valeur haute de Ct montre qu'il n'y a presque pas d'ADNg dans l'échantillon purifié donc sa présence ne peut pas expliquer l'amplification importante de la séquence intronique.

Nous pensons que les séquences introniques présentes dans l'échantillon d'ARNm viennent de molécules pré-ARNm, qui sont un état de transition entre la transcription et l'épissage. De telles molécules possèdent déjà la queue poly-A avant l'épissage, ce qui justifie la présence de séquences introniques lors de la purification avec les billes Oligo(dT).

Finalement, l'ensemble de ces résultats montre que cet essai de multiplexage ne peut pas être utilisé pour quantifier de manière spécifique l'ADNg et l'ARNm en même temps. Nous pensons que le pré-ARNm qui contient des introns peut être rétro-transcrit puis identifié comme de l'ADNg pendant la qPCR.

iii. Essai de qPCR non multiplexée

Comme nous ne pouvions pas avoir simultanément, dans la même réaction de qPCR, la quantification de l'ADNg et l'ARNm, il a été nécessaire d'effectuer un essai un peu plus contraignant en terme expérimental mais pour lequel la spécificité était préservée, c'est pourquoi ces analyses ont été réalisées par type d'information souhaitée comme expliqué ci-dessous. Les courbes de calibration et les séquences de d'amorces et de sondes sont données en Annexe 2.

Pour quantifier l'ADNg, nous effectuons une qPCR avec le kit contenant du SYBR Green. L'absence de RT garantit la non amplification et détection d'ARN et donc que seulement l'amplification de l'ADNg est mesurée.

Pour quantifier l'ARNm, nous effectuons une RT-qPCR avec le kit Cell direct et une sonde Taq Man située à cheval entre deux exons, comme décrit dans l'essai de multiplexage, ce qui garantit l'amplification de l'ARNm uniquement.

Pour chaque expérience, nous avons dû choisir si nous effectuions seulement un des deux essais et donc n'obtenir qu'une quantification sur les deux ou diviser l'échantillon en 2 pour effectuer chaque essai indépendamment. En général, pour les expériences en tube nous avions assez de matériel pour effectuer les deux essais. Par contre pour les expériences en gouttes, à cause de la faible quantité de matériel et pour éviter les manipulations à la pipette qui peuvent être une cause de perte de matériel sur les parois des cônes, nous n'effectuions souvent qu'un type de quantification, quitte à faire deux fois plus d'expériences pour obtenir une quantification sur l'ADNg et sur l'ARNm.

4. Autres choix expérimentaux

Un avantage du système microfluidique utilisé est qu'il est simple à mettre en œuvre et ne nécessite pas de microfabrication. Les gouttes de 100 nL sont générées dans un capillaire grâce au pipetage séquentiel (via un robot de pipetage) de solutions aqueuses et d'huile fluorée placées dans une plaque multi-puits. Le capillaire, de diamètre interne de 300µm et externe de 600µm, est en PTFE, un matériau hydrophobe et mouillant pour l'huile fluorée, ce qui permet la formation de gouttes de forme allongée entourées d'huile et d'un film de lubrification qui limite la contamination entre gouttes. Le débit de la phase continue dans le capillaire est appliqué par un pousse-seringue (Nemesys, Cetoni) et le positionnement du bout ouvert du tubing est ajusté avec un bras robot (Rotaxys, Cetoni). Ceux-ci sont contrôlés et programmés grâce au logiciel QmixElements de Cetoni. Le capillaire est positionné entre les pointes de la pince magnétique pour l'extraction et la redispersion des billes magnétiques (Figure 39).

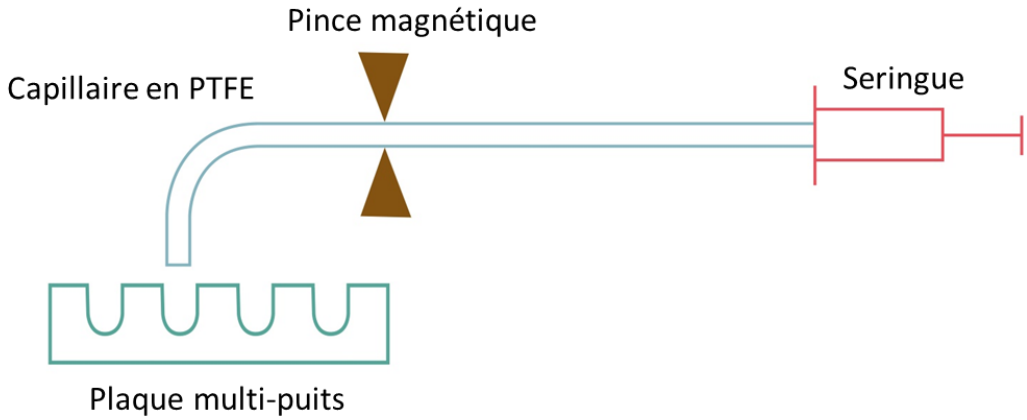


Figure 39 : Schéma de l'expérience.

L'huile fluorée utilisée pour la phase continue est la FC40 (Fluorinert FC40, F9755 de Sigma, viscosité de 4.1 mPa.s à 25°C), qui permet la formation d'un train de gouttes bien isolées les unes des autres et entourées d'un film de lubrification. Le tensioactif choisi est le 1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-decanol (PFD, de Fluorochem) à la concentration de 2% en masse. Il permet la formation de gouttes stables dans le capillaire mais ne les empêche pas de fusionner lorsqu'elles entrent en contact. La tension de surface mesurée par la méthode de la goutte pendante avec du PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, une solution tampon adapté pour la suspension de cellules) et l'huile fluorée avec 2% en PFD est environ 10 mN/m [39].

III. Résultats des expériences d'extraction spécifique d'ARNm et d'ADNg

Les expériences décrites dans cette partie retracent les différentes étapes que nous avons réalisées afin d'optimiser et valider notre approche dont le but final serait la séparation physique de l'ADNg et l'ARNm en goutte sur des cellules uniques. Nous avons procédé en augmentant graduellement la complexité de l'échantillon afin de valider la faisabilité de l'approche proposée. Nous avons tout d'abord commencé par extraire l'ADN et l'ARNm à partir d'un mélange d'ADN et d'ARN pré-purifiés. Ensuite les extractions ont été effectuées sur des lysats cellulaires préparés en tube puis directement sur des gouttes contenant quelques cellules. A chaque étape, les performances du système en goutte sont évaluées et les résultats sont comparés avec les extractions effectuées en tube de manière non microfluidique. Cette progression étape par étape nous a permis de nous confronter et répondre progressivement aux nouvelles problématiques posées par la complexification de l'échantillon.

1. Séparation ARN/ADN à partir d'un mélange d'ARN et d'ADN purifiés

Dans cette partie, la séparation a été réalisée à partir d'un mélange d'ADN et d'ARN purifiés. Pour ce faire, l'ADN et l'ARNm ont été préalablement extraits de cellules de lignées de cancer du sein humain (lignée cellulaire MDA MB 231) avec les kits d'extraction précédemment mentionnés (NucleoSpin pour l'ADN et RNeasy pour l'ARN). Les solutions obtenues sont quantifiées au NanoDrop et au Qubit puis mélangées de sorte à obtenir des proportions similaires à ce qui est rencontré dans une cellule humaine (typiquement 1/4 à 1/5 en ADN/ARN).

i. Extraction en tube

Dans un premier temps, nous avons extrait l'ARNm et l'ADNg successivement avec les billes magnétiques Oligo(dT) et AMPure à partir de différentes concentrations d'ARN (10, 2 et 0.4 ng/µL) et d'ADN (2, 0.4 et 0.08 ng/µL). Nous avons ensuite effectué des (RT-)qPCR pour quantifier l'ARNm ou l'ADN présents dans la solution dans laquelle les billes Oligo(dT) sont redispersées, la solution dans laquelle les billes AMPure sont redispersées et le surnageant, c'est-à-dire ce qui reste dans le tube initial. Nous pouvons ainsi comparer les quantités obtenues d'ADN et d'ARNm dans chaque solution et les rapporter à la somme des trois pour avoir la proportion. Idéalement, 100% de l'ARNm devrait être capturé par les billes Oligo(dT) et 100% de l'ADNg par les billes AMPure.

Pour l'ARNm (Figure 40), nous mesurons un taux de capture autour de 88% pour des concentrations en ARNm de 10 à 0.4 ng/µL ce qui correspond à des quantités en tube de 100 à 4 ng. La quasi-totalité de l'ARNm en solution restant et capturé par les billes AMPure, ce qui n'est pas étonnant car ces billes peuvent capturer tous types d'acides nucléiques. Le taux de capture reste sensiblement le même pour les trois concentrations étudiées.

Pour l'ADN, les taux de capture par les billes AMPure sont plus faibles et les expériences semblent moins reproductibles (coefficient de variation autour de 20%). De plus, le taux de capture semble dépendre de la concentration initiale de l'échantillon mais cette dépendance apparait non triviale à expliquer à ce stade. Dans la fiche technique fournie avec les billes, les performances de capture sont données pour quelques concentrations et volumes de manière principalement phénoménologique et il est difficile de prévoir l'évolution du taux de capture en fonction de paramètres tels que le volume de réaction ou la concentration.

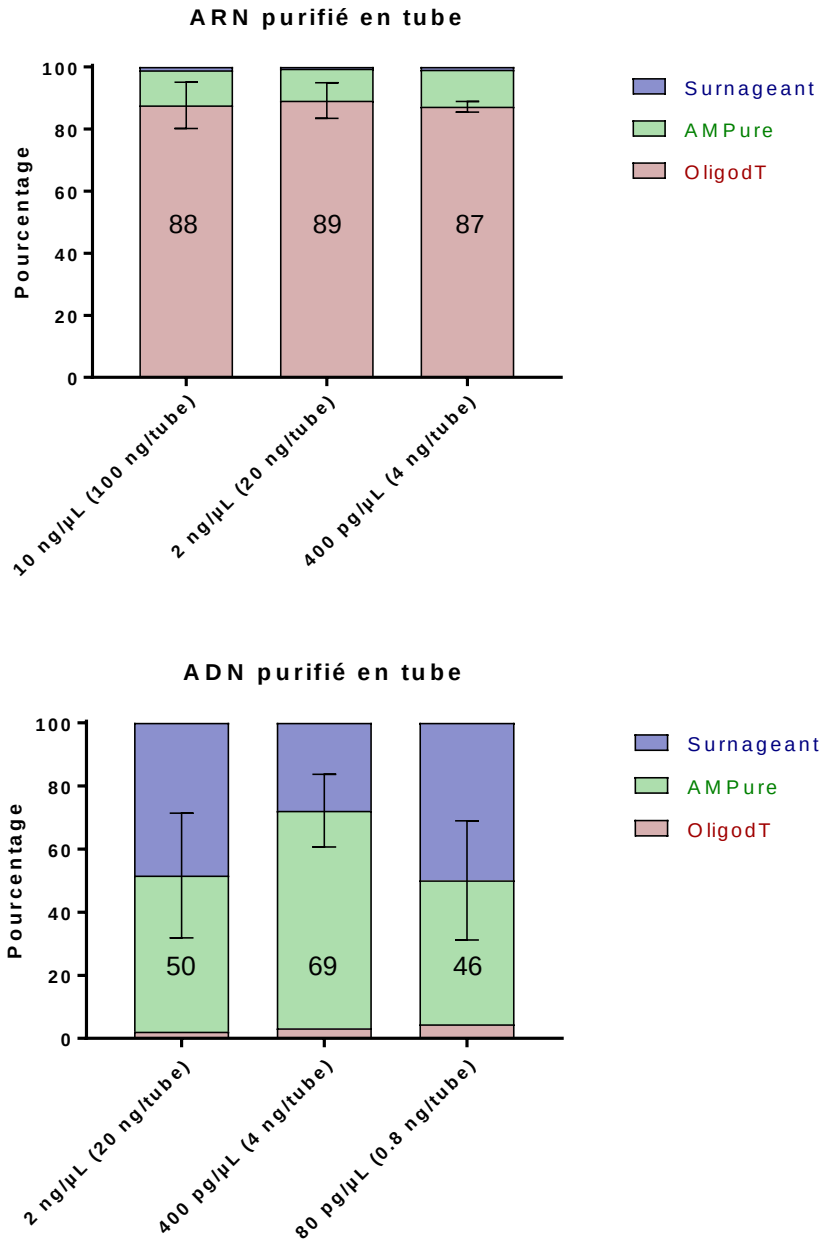


Figure 40 : Pourcentage de la quantité d'ARNm ou d'ADN mesurée dans chacune des trois solutions finales. Les barres d'erreur sont l'écart type pour la quantité capturée par les billes Oligo(dT) pour l'ARNm et par les billes AMPure pour l'ADN. La plus faible concentration correspond à une vingtaine de cellules/µL. Les extractions pour chaque concentration ont été effectuées trois fois et chaque réaction de qPCR est effectuée en triplicat.

Ces performances mesurées en tubes nous donne une base de comparaison pour les performances en gouttes. Les volumes de travail en gouttes sont diminués d'un facteur 100, avec un volume de travail de 10 µL en tube et de 100 nL en goutte. Les concentrations en billes et les rapports de volumes des solutions sont préservés mais on va donc travailler sur des quantités de biomolécules 100 fois plus faibles.

ii. Extraction en gouttes

L'extraction en gouttes, comme en tube, se fait en deux étapes : une première étape avec la capture de l'ARNm sur les billes Oligo(dT) et ensuite cette goutte qui a été déplétée en ARNm est fusionnée avec les billes AMPure pour réaliser la deuxième étape avec la capture de l'ADN (Figure 41).

Dans un premier temps (Figure 41 haut), un train de gouttes de 100nL est pipeté contenant : une goutte contenant les billes Oligo(dT), une goutte d'échantillon, une goutte de la solution de lavage fournie avec le kit des billes et une goutte d'eau pour l'élution. Grâce à la pince magnétique, les billes sont transférées vers la goutte d'échantillon. Celle-ci effectue alors des va-et-vient pendant 5 min à température ambiante pour que les recirculations internes de la goutte augmentent le mélange des billes et favorisent la capture de l'ARNm. Toujours avec la pince magnétique, les billes sont piégées sous la forme d'un cluster et ensuite une étape de lavage est réalisée en mettant en contact ce cluster avec la goutte de lavage. Les billes sont ensuite transférées dans une goutte contenant de l'eau pour l'élution des ARNm. Cette goutte d'eau est alors approchée délicatement du bout du capillaire pour être récupérée dans un tube contenant le mélange pour effectuer la PCR ensuite. Nous avons aussi récupéré la goutte de lavage pour voir si une partie de l'ADN se retrouve dans cette goutte. Dans le protocole en tube, la goutte de lavage a été mélangée avec l'échantillon initial.

Dans un deuxième temps (Figure 41 bas), la goutte d'échantillon qui a été déplétée en ARNm et qui est toujours dans le capillaire est approchée de l'extrémité du capillaire et deux nouvelles gouttes sont pipetées : une contenant la solution de PEG/NaCl et les billes magnétiques AMPure XP et une goutte d'eau de nouveau pour l'élution. Contrairement aux billes Oligo(dT), les billes AMPure ne peuvent pas simplement être transférées dans la goutte d'échantillon avec les pinces magnétiques car la solution de stockage dans laquelle elles se trouvent contient la concentration en PEG et NaCl nécessaire à la capture (20% (w/v) de PEG-8000 et 2.5M de NaCl). Il y a donc nécessité d'ajouter une étape de fusion. La goutte contenant la solution de PEG/NaCl étant environ vingt fois plus visqueuse (19.5 mPa.s [28]) que celle contenant l'échantillon, elle est plus rapide [40] et peut rattraper la goutte d'échantillon et fusionner avec elle (ce principe a été par exemple utilisé dans [41]). La différence de vitesse entre les deux gouttes est suffisante pour que, en étant initialement séparées d'environ 5 mm, elles entrent en contact après avoir parcouru moins de cinq centimètres dans le capillaire avec un débit de la phase continue de 0.2 µL/s (soit environ 3mm/s dans le capillaire de diamètre interne 300 µm). La fusion peut avoir lieu de manière passive grâce au tensioactif utilisé (PFD 2%), qui n'empêche pas deux gouttes en contact

de fusionner. La concentration en PEG/NaCl voulue est ajustée en choisissant le volume de la goutte pipetée par rapport au volume de la goutte avec laquelle elle fusionne, ici la goutte d'échantillon préalablement déplétée en ARNm. Après 5 min d'incubation à température ambiante, pendant lesquelles le contenu de la goutte est mélangé par les circulations créées par le va-et-vient, les billes magnétiques sont transférées, avec la pince, dans la goutte d'eau qui est ensuite récupérée dans un tube pour la PCR. La goutte de surnageant est aussi récupérée dans un tube de PCR pour l'analyse des espèces qui n'ont été capturées ni par les billes Oligo(dT), ni par les billes AMpure.

Concernant la récupération de la goutte dans le tube, nous avons vérifié que la présence d'un peu d'huile fluorée dans le tube PCR ne perturbe ni la réaction de PCR ni le signal de fluorescence mesuré. Une goutte de 100 nL est récupérée dans un volume de 20 ou 25 µL de mix pour la qPCR. Nous avons aussi, tout au long de nos expériences, effectué des contrôles négatifs en remplaçant l'échantillon par de l'eau pour vérifier l'absence de contamination de nos réactifs et ainsi que l'absence de contamination croisée en goutte dans un même capillaire.

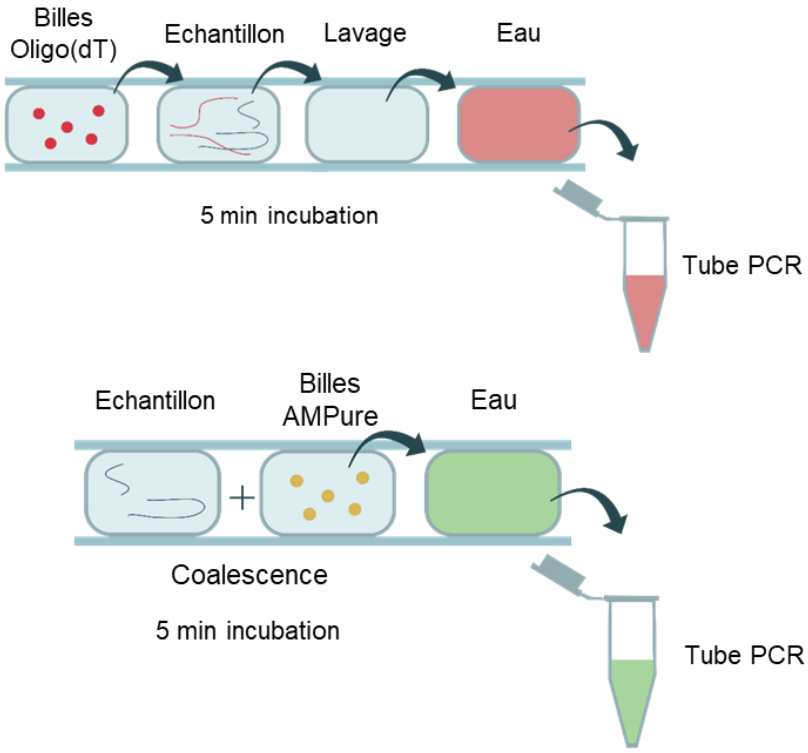


Figure 41 : Principe de l'expérience en gouttes. Les flèches entre gouttes représentent le déplacement des billes magnétiques d'une goutte à l'autre.

Les résultats de l'extraction en goutte sur un mélange d'ADN et d'ARN purifiés sont représentés sur la Figure 42. Les quantités d'ADN et d'ARNm présentes dans chaque goutte a été mesurée par (RT-)qPCR à la fin de l'expérience et sont rapportés à la somme de ces quantités pour avoir les pourcentages de chacune de ces espèces. La quantité indiquée correspond à la quantité totale d'ARN ou d'ADN présent initialement dans la goutte d'échantillon de 100nL. Ces quantités représentent la quantité d'ARN présente dans environ 100 et 10 cellules humaines pour les expériences où l'ARN est quantifié et la quantité d'ADN présente dans environ 500 et 50 cellules humaines pour les expériences sur l'ADN. Nous vérifions pour chaque expérience que cette quantité correspond à la somme des quantités mesurées dans chaque goutte à la fin, ce qui permet de s'assurer qu'il n'y a pas (ou peu) eu de pertes pendant l'expérience. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentages de récupération de chaque espèce pour faciliter la comparaison entre expériences.

Pour l'ARNm, l'efficacité de capture pour les deux concentrations testées est similaire et autour de 70%. Par comparaison, cette efficacité moyenne est un peu plus faible que celle obtenue en tube (Figure 40) pour des concentrations similaires mais pour une quantité totale de matériel 100 fois plus faible. Comme attendu, la quantité d'ARN présente dans la goutte de lavage est négligeable puisque les brins sont principalement capturés sur les billes Oligo(dT).

Pour l'ADN, les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus en tube, avec une différence de capture assez importante selon la quantité de matériel initiale. Comme en tube, la proportion d'ADN retrouvée dans la goutte d'élution des billes Oligo(dT) est très faible (< 5%), ce qui montre, comme attendu, une très bonne spécificité de la capture par ces billes. Enfin, la quantité d'ADN dispersé dans la solution de lavage est faible (< 3%). Si cette quantité avait été importante, il aurait été intéressant de chercher à faire fusionner cette goutte de lavage avec l'échantillon, comme ce qui est fait en tube, pour pouvoir capturer l'ADN qui y est dispersé sur les billes AMPure lors de la deuxième étape.

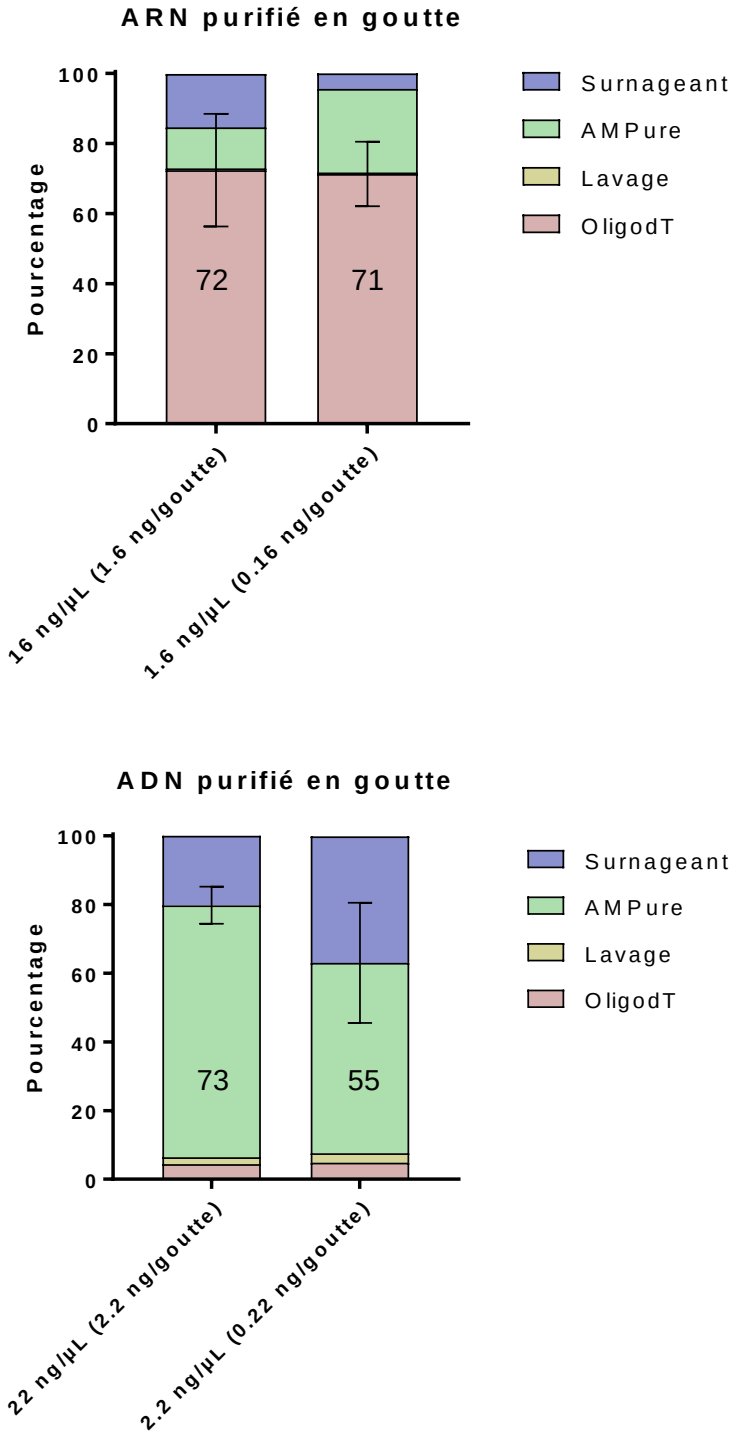


Figure 42 : Pourcentages de la quantité d'ARNm ou d'ADN mesurée dans chacune des quatre gouttes finales : la goutte contenant l'élution des billes Oligo(dT), celle de lavage, celle contenant l'élution des billes AMPure et celle contenant le surnageant finale. Les quantités sont indiqués pour des gouttes de 100 nL. Les barres d'erreur sont l'écart type pour la quantité capturée par les billes OligodT pour l'ARNm et par les billes AMPure pour l'ADN. Les extractions pour chaque concentration ont été effectuées six fois.

Ces expériences nous ont permis de mettre en place le protocole d'extraction en goutte et de montrer que les résultats obtenus en goutte sont comparables avec ceux obtenus en tube avec une technique de pipetage conventionnelle et ce malgré une quantité en biomolécules environ 100 fois plus faible, suggérant que les pinces magnétiques peuvent effectuer l'extraction séquentielle de l'ARNm et de l'ADN de manière efficace. Ces résultats constituent une première étape vers l'analyse multimodale de cellules uniques.

2. Séparation à partir de lysat cellulaire

Dans cette partie, les extractions séquentielles en tube et en goutte ont été réalisées directement à partir d'un lysat cellulaire. Le même type de cellules que précédemment (lignée cellulaire MDA MB 231) sont lysées dans la solution de lyse et de capture fournie avec le kit des billes Oligo(dT), composée de 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS et 5 mM DTT. Le nombre de cellules est estimé avec une cellule de Malassez (Glasstic Slides de Kova) préalablement à la lyse. La présence de LiDS et de DTT dans la solution de lyse complique la quantification des acides nucléiques dans le lysat car ils sont des inhibiteurs de la réaction de PCR [42] [43]. Pour réduire leur concentration jusqu'à ce qu'ils aient un effet négligeable sur la quantité d'ADN ou d'ARN mesurée, nous avons estimé expérimentalement qu'il faut que le volume d'échantillon de 1µL utilisé pour la (RT)qPCR soit dilué par 100 dans de l'eau (une dilution par 10 suffit pour les gouttes car leur volume n'est déjà que de 100 nL). Ces dilutions conduisent à mesurer des quantités d'ADN ou ARN très faibles, ce qui pourrait être une source de surestimation de la quantité présente dans le surnageant (la courbe linéarisée de calibration de la qPCR est en général au-dessus de la courbe réelle pour les concentrations faibles). Cette surestimation doit cependant être légère au vu de la linéarité des courbes de calibration dans les gammes de concentrations avec lesquelles nous avons travaillé dans cette partie (au total environ 10 ng d'ARN et 1ng d'ADNg) (Annexe 2). Cette surestimation doit être plus marquée lorsque nous travaillerons sur un faible nombre de cellules (<10), dans la partie suivante. Néanmoins, même aux faibles concentrations, l'impact de cette non linéarité a été estimé, à partir des courbes de calibration, à moins de 5% sur l'efficacité d'extraction mesurée.

D'après le protocole des billes Dynabeads Oligo(dT), celles-ci doivent subir deux lavages après incubation avec l'échantillon afin d'extraire efficacement l'ARNm à partir de lysat cellulaire. Pour l'extraction en tube comme en goutte, les expériences ont été faites en gardant séparées ces solutions de lavage de l'échantillon pour quantifier la quantité d'ADN présente dans ces solutions

et estimer l'utilité des lavages. D'autre expériences ont été faites en ajoutant les solutions de lavage à l'échantillon restant afin de limiter la perte d'ADN an amont de sa capture sur les billes AMPure. Les compositions de ces solutions de lavage sont respectivement : 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA et 0.1% LiDS pour le lavage A et 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl et 1 mM EDTA pour le lavage B.

i. Extraction en tube

Les résultats pour les extractions en tube sont représentés sur la Figure 43. Sur les deux graphiques la barre de gauche montre les résultats obtenus en n'ajoutant pas les lavages à la solution initiale et la barre de droite montre les résultats obtenus en ajoutant les lavages à la solution initiale entre l'extraction de l'ARNm et celle de l'ADN. La concentration de l'échantillon est d'environ 1000 cellules lysées par µL.

Pour l'ARN, le taux de capture sur les billes Oligo(dT) ne devrait pas dépendre de l'ajout ou non des solutions de lavage puisque que la capture sur ces billes intervient avant le lavage. C'est ce que l'on peut constater sur le graphique car, bien que les moyennes soient assez différentes, les barres d'erreurs se recouvrent largement. Ce taux de capture, autour de 60%, est sensiblement plus faible que celui de 88% obtenu en tube sur un mélange d'ADN et d'ARN purifiés. Cela peut être expliqué par la présence des composants des cellules lysées (protéines, lipides, débris cellulaires) qui peuvent affecter la capture.

Pour l'ADN, le taux de capture des billes AMPure sans ajout des solutions de lavage (Figure 43 bas gauche) est de 32%, ce qui est aussi en diminution par rapport à l'extraction à partir d'ARN et d'ADN purifié. La quantité d'ADN dispersé dans les solutions de lavage n'est pas négligeable (somme A + B > 10%) donc l'expérience a été réitérée mais en ajoutant ces lavages à l'échantillon avant la capture de l'ADN. Le volume de la solution de billes AMPure contenant le PEG/NaCl est adapté pour conserver la ratio 1/1 en volume échantillon/volume de solution de billes car le volume de l'échantillon augmente à cause de l'ajout des solutions de lavage. Les résultats montrent un taux de capture de l'ADN très faible (<10%) sur les billes AMPure. Ce résultat est difficile à expliquer, d'autant qu'il ne se retrouve pas en gouttes (montré dans le paragraphe suivant) donc ne peut pas être simplement expliqué par la composition de la solution qui est la même en goutte. Une piste pourrait se trouver dans la fiche de données des billes AMPure où il est expliqué que le volume de la réaction peut avoir un impact qui semble non trivial à prévoir sur le taux de capture des billes. Cette piste semble cependant insuffisante pour expliquer ce résultat

reproduit plusieurs fois. Une solution pour améliorer la capture pourrait être d'allonger le temps d'incubation de 5 minutes à 20 minutes, ce qui est fait dans le protocole de G&T.

Bien que l'extraction de l'ADN ne soit pas très bonne avec ce protocole en tube, nous avons réalisé ce protocole en goutte pour comparer les performances.

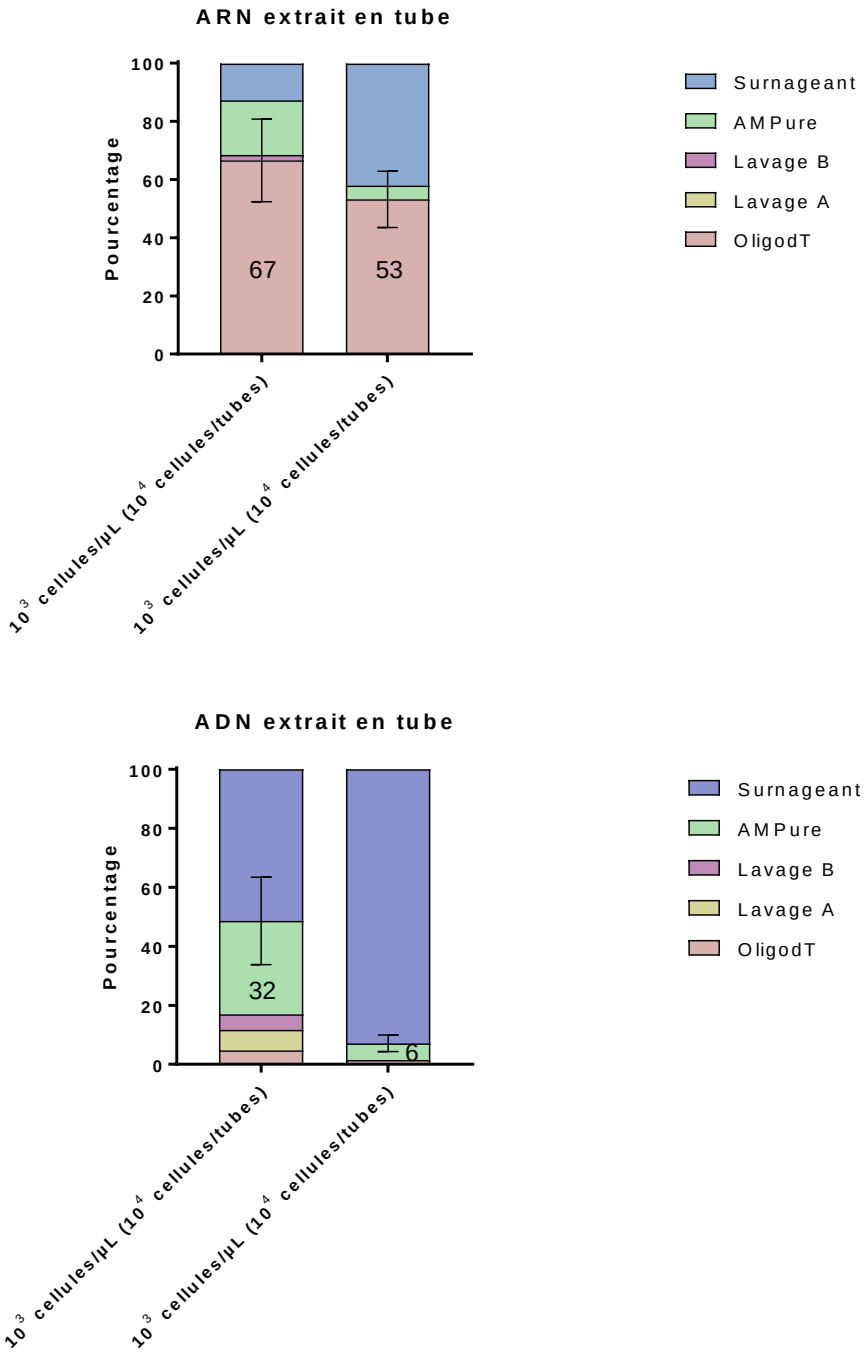


Figure 43 : Pourcentages de la quantité d'ARNm ou d'ADN mesurée dans chacune des solutions. A gauche, les lavages n'ont pas été ajoutés à l'échantillon, à droite, ils ont été ajoutés Les barres d'erreur sont l'écart type pour la quantité capturée par les billes Oligo(dT) pour l'ARNm et par les billes AMPure pour l'ADN. Les extractions pour chaque concentration ont été effectuées quatre fois et chaque réaction de qPCR est effectuée en triplicat.

ii. Extraction en gouttes

Le protocole en goutte, représenté Figure 44 est similaire à celui de l'extraction sur un mélange d'ADN et d'ARN purifié. Une deuxième goutte de lavage, comme dans les expériences en tubes, est ici ajoutée au premier train de gouttes. Pour la deuxième étape concernant l'extraction sur les billes AMPure, soit la goutte d'échantillon est fusionnée avec une goutte de billes AMPure de 100 nL, soit elle est fusionnée avec les deux gouttes de lavages plus une goutte contenant les billes AMPure de 300 nL pour conserver le rapport 1/1 en volume ajouté. Le protocole pour la fusion de ces gouttes est décrit dans un paragraphe suivant.

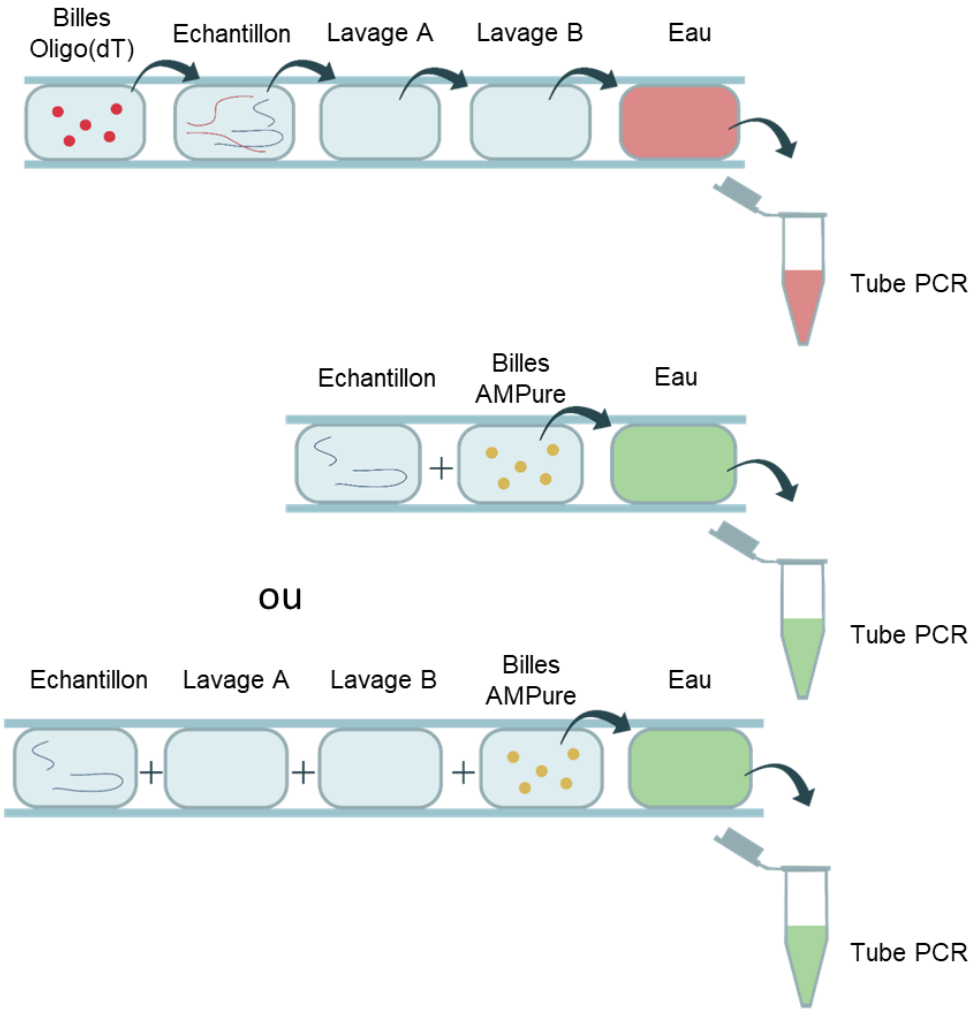


Figure 44 : Schéma du processus microfluidique. Les temps d'incubation pour les deux types de billes sont de 5 minutes à température ambiante.

Les résultats de l'extraction sont montrés Figure 45. Les expériences ont été réalisées avec environ 100 cellules lysées par goutte, ce qui revient à la même concentration que ce qui a été fait en tube. Comme précédemment, les barres à gauche sont obtenues sans l'ajout des lavages dans la solution d'échantillon. Dans ce cas les gouttes de lavage sont récupérées entre les deux étape pour être analysées. Les barres à droites sont les résultats obtenus dans le cas où les gouttes de lavage sont fusionnées avec la goutte d'échantillon déplétée en ARNm et la goutte de billes AMPure.

Dans le cas de l'ARNm (Figure 45 haut), on obtient des résultats similaires dans les deux conditions, ce qui est cohérent avec ce qui est attendu et ce qui a été observé en tube. Les résultats de l'efficacité d'extraction sont similaires à ceux obtenus en tube avec une moyenne d'extraction sur les billes Oligo(dT) autour de 60%. La majorité de l'ARNm restant est capturé par les billes AMPure dans les deux cas.

Pour l'ADN (Figure 45 bas) en l'absence de fusion des gouttes de lavage, le taux d'extraction sur les billes AMPure est assez faible, environ 20% de l'ADN total présent est récupéré après élution des billes AMPure, et on retrouve une proportion importante d'ADN dans les solutions de lavage (presque 50%). La fusion des gouttes de lavage avec celle d'échantillon semble donc tout à fait nécessaire pour essayer d'améliorer les rendements de capture de l'ADN présent dans les lysats. Lorsqu'elle est réalisée cette fusion préalable des gouttes de lavage avec la goutte échantillon semble extrêmement efficace, le taux de capture augmente remarquablement pour atteindre une moyenne de 69%, ce qui est bien meilleur que ce qui avait été obtenu en tube.

Ces résultats sont extrêmement encourageants car ils démontrent pour la première fois dans un tel dispositif la possibilité d'extraire séquentiellement en gouttes de l'ARNm et de l'ADNg à partir d'un même lysat cellulaire.

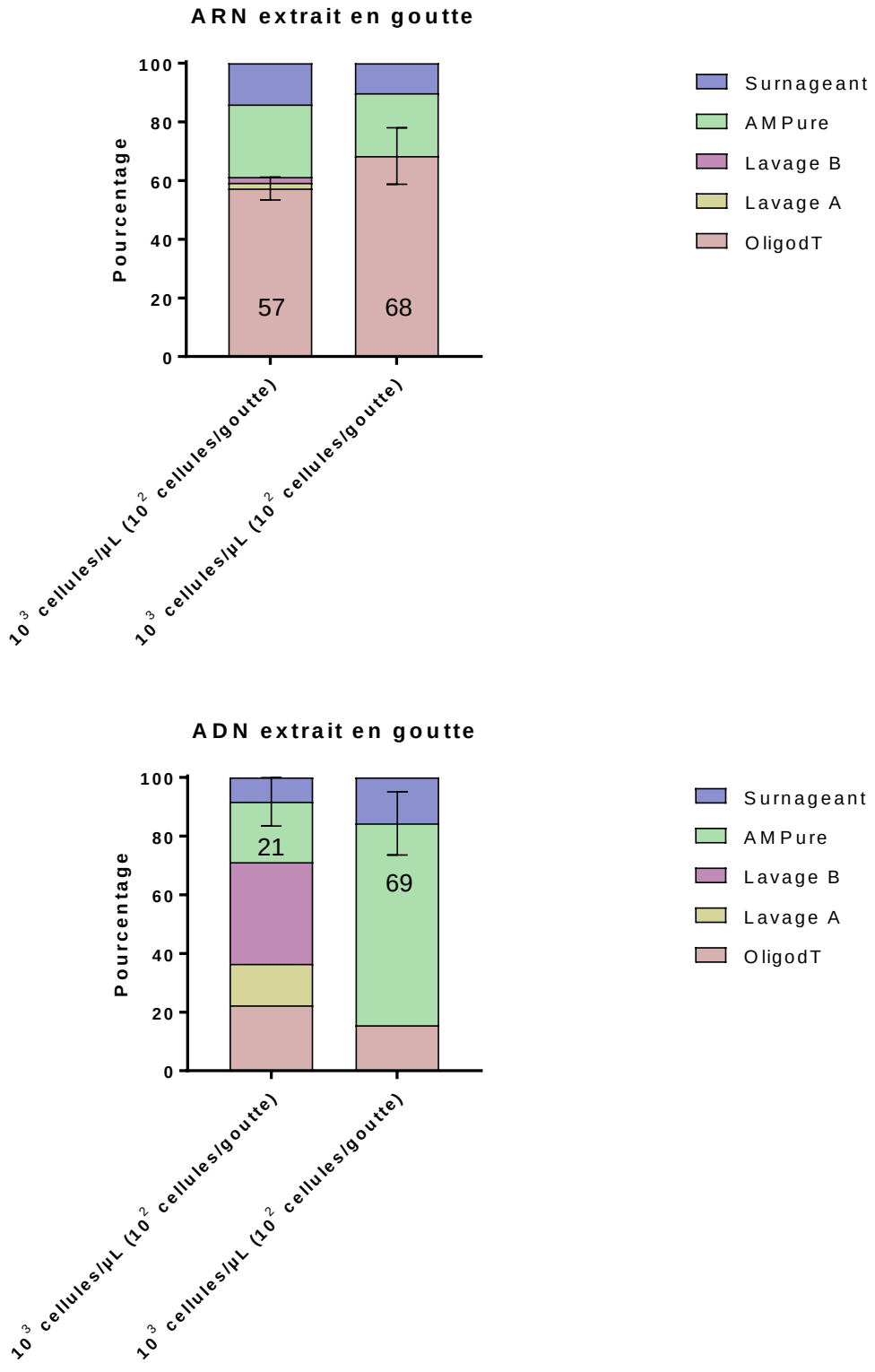


Figure 45 : Pourcentage de la quantité d'ARNm ou d'ADN mesurée dans chacune des gouttes. A gauche, les lavages n'ont pas été ajoutés à l'échantillon, à droite, ils ont été ajoutés. Les barres d'erreur sont l'écart type pour la quantité capturée par les billes Oligo(dT) pour l'ARNm et par les billes AMPure pour l'ADN. Les extractions pour chaque concentration ont été effectuées au moins quatre fois.

iii. La fusion passive de deux gouttes

La fusion passive des gouttes dans le capillaire, basée comme indiqué précédemment sur des différences de vitesses des gouttes, a été plus compliquée à mettre en œuvre lorsque l'échantillon était du lysat cellulaire. En effet, lorsque la goutte d'échantillon était constituée d'un mélange d'ADN et d'ARN, la goutte contenant les billes AMPure était plus visqueuse et de tension de surface plus faible que celle de l'échantillon, donc plus rapide que celle-ci pour un même débit de la phase continue. Dans ce cas, comme la goutte plus rapide est placée derrière la goutte plus lente (Figure 46 méthode 1), il suffit s'aspirer les deux gouttes plus avant dans le capillaire pour qu'elles entrent en contact et fusionnent.

Lorsque la goutte d'échantillon est composée de lysat cellulaire, la tension de surface de la goutte est fortement diminuée par la composition du tampon de lyse et des cellules, et la viscosité peut être un peu augmentée. Nos expériences ont montré que dans ce cas, la goutte d'échantillon est plus rapide que la goutte des billes AMPure (Figure 46 méthode 2). Ainsi, en les aspirant dans le capillaire, elles auront tendance à s'éloigner. Or, pour une goutte allongée dans un canal à section circulaire, la différence entre la vitesse de la goutte et la vitesse moyenne de la phase continue est proportionnelle à la vitesse de la goutte à la puissance 5/3 : $V_d - V_{oil} \propto \left(\frac{\mu}{\gamma}\right)^{2/3} {V_d}^{5/3}$ avec μ la viscosité de la goutte et γ sa tension de surface [40], ce qui signifie que plus la vitesse d'une goutte est élevée, plus cette vitesse est éloignée de celle de l'huile et plus la différence de vitesse entre deux gouttes sera élevée (Figure 47). J'ai donc proposé ici une nouvelle méthode qui permet de s'affranchir de cette limitation : la méthode proposée est d'aspirer lentement (0.05 µL/s) les gouttes dans le capillaire afin que leur écart augmente peu car leurs vitesses sont proches de celle de la phase continue, puis de pousser les gouttes dans la direction opposée et rapidement (0.5 µL/s) afin que leur différence de vitesses soit grande et que la goutte plus rapide rattrape la goutte plus lente. Cette méthode fonctionne bien expérimentalement mais il faut parfois répéter le processus d'aller-retour plusieurs fois avant d'avoir une rencontre entre les deux gouttes et donc le processus pour fusionner les gouttes peut durer plus d'une dizaine de minutes.

Pour accélérer ce processus et augmenter sa robustesse, nous avons proposé une nouvelle méthode intitulée ici méthode 3 (Figure 46). Dans ce cas, peu d'huile est aspirée après la dernière goutte, de sorte que, lors de la phase de retour, les gouttes se trouvent bloquées et ralenties par le ménisque. En effet, comme les gouttes vont plus vite que l'huile dans un canal à section circulaire, ce processus permet d'obtenir une fusion plus rapide entre les gouttes, typiquement en diminuant de moitié le temps nécessaire à la mise en contact des gouttes à fusionner. Ce procédé est d'autant

plus intéressant lorsqu'il y a plus que deux gouttes à fusionner, comme avec les gouttes de lavages, et donc qu'initialement les deux gouttes aux extrémités sont relativement éloignées l'une de l'autre. Ainsi, pour le train de gouttes composé de la goutte de billes AMPure, des deux gouttes de lavages et de la goutte d'échantillon, réparties initialement sur 5 cm de tubing, le temps nécessaire à la fusion passive de ces quatre gouttes est de 5 minutes avec la méthode 3 et elle est obtenue dans 100% des cas.

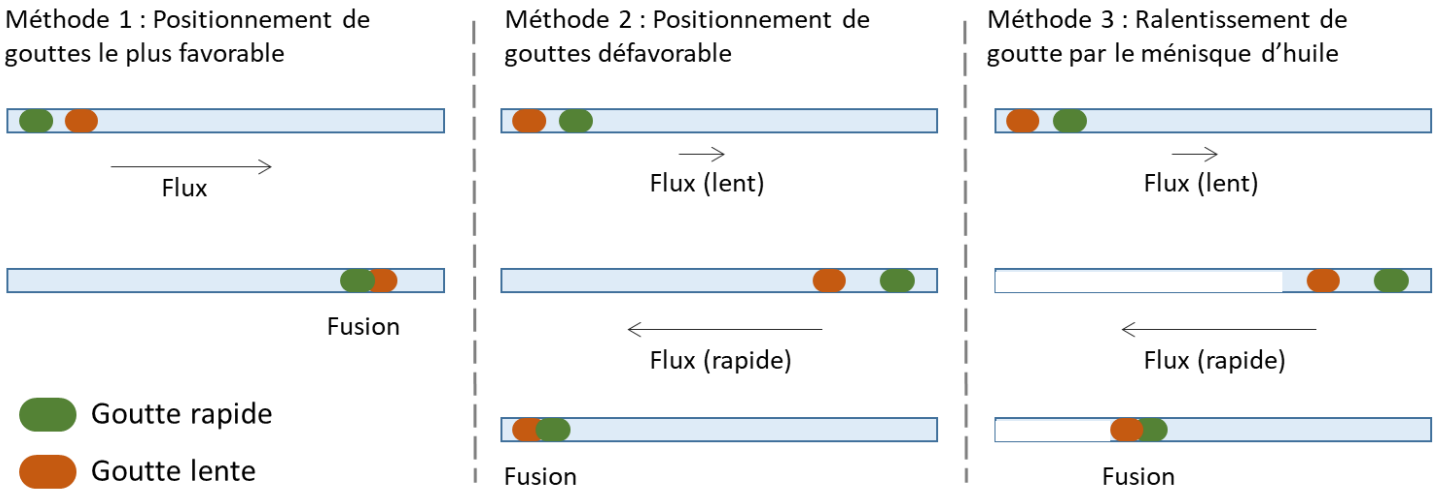


Figure 46 : Schéma de trois méthodes pour la fusion passive de gouttes confinées dans un capillaire à section circulaire. Dans la méthode 1, la goutte la plus rapide est pipetée après la goutte la plus lente donc il suffit d'aspirer les gouttes pour qu'elles entrent en contact et fusionnent. Dans la méthode 2, la goutte la plus rapide est aspirée avant la goutte la plus lente donc elles s'éloignent lors de l'aspiration. Cependant, si le débit d'aspiration est lent (0.05 µL/s), les gouttes s'éloignent de quelques millimètres seulement car leurs vitesses restent proches de celle de le phase continue. Ainsi, si un débit important est imposé dans le sens inverse (5 µL/s), leur différence de vitesses sera plus importante et elles peuvent entrer en contact et fusionner. La méthode 3 utilise le même principe mais la mise en contact est accélérée par le ralentissement de la dernière goutte par le ménisque d'huile.

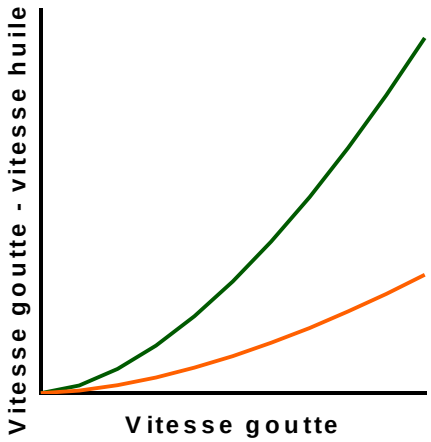


Figure 47 : Evolution de la différence de vitesses entre l'huile et les gouttes en fonction de la vitesse des gouttes. L'écart entre la vitesse d'une goutte « lente » (orange) et d'une goutte « rapide » (vert) augmente quand la vitesse des gouttes augmente avec une puissance 5/3.

Finalement, dans cette partie nous avons montré que nous pouvons séparer et purifier l'ADN et l'ARNm à partie d'un lysat cellulaire d'environ 100 cellules par gouttes avec notre système de pince magnétiques. Les performances de la séparation, même si elles sont légèrement moins bonnes qu'avec un échantillon pré-purifié pour l'ARNm, restent correctes et comparables à celles d'un échantillon pré-purifié.

3. Séparation à partir de quelques cellules entières

Dans cette partie, je présente les expériences faites à partir de quelques cellules entières encapsulées et lysées en goutte. Le nombre de cellules par goutte était inférieur à 10.

i. Isolation des cellules

La première étape est d'encapsuler les cellules en goutte. Pour cela, dix gouttes de 50 nL espacées par 2 mL d'huile fluorée sont générées dans un capillaire par aspiration dans une plaque multi-puits. La solution aspirée est une suspension de cellules dans du PBS. Les gouttes ainsi générées contiennent moins d'une dizaine de cellules par gouttes (typiquement entre 3 et 7 cellules). Les gouttes sont visualisées sur un microscope optique, identifiées par leur position dans le train de goutte et les cellules sont dénombrées pour chaque goutte. Pour la visualisation, le capillaire contenant les gouttes est fixé sur une lame de verre et de l'huile fluorée est déposée dessus pour limiter la diffraction et avoir une meilleure continuité de l'indice optique.

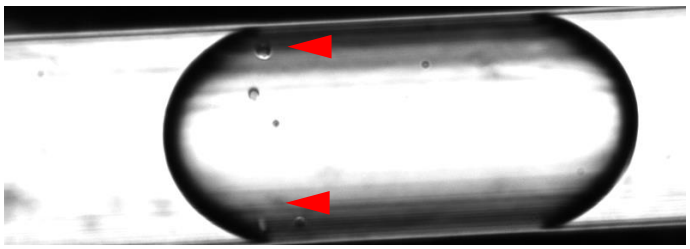


Figure 48 : Photo d'une goutte de 50 nL visualisée au microscope optique (objectif 10X). Les flèches rouges indiquent des cellules. Le diamètre interne du capillaire est 300 µm.

ii. Insertion dans le train de goutte et lyse

Le processus d'extraction en goutte est similaire à celui décrit précédemment, avec les mêmes étapes de lavage que pour l'extraction à partir de lysat cellulaire. La différence est qu'il faut introduire dans le train une goutte contenant les cellules préalablement dénombrées et les lyser en faisant fusionner la goutte avec une goutte de tampon de lyse (Figure 49). Une étape supplémentaire est donc ajoutée lors de la génération du premier train de gouttes. Après la génération de la goutte contenant les billes Oligo(dT), celle-ci est aspirée jusqu'à une jonction T qui permet d'insérer la goutte contenant le nombre de cellules voulu (Figure 50). Cette jonction T est réalisée en PDMS (polydimethylsiloxane, Sylgard 184) à partir d'un contre-moule en laiton micro usiné. Le haut et le bas de la puce sont assemblés pour créer des microcanaux et la puce est fermée grâce à un traitement au plasma à oxygène qui active les surfaces et permet la création de liaisons covalentes entre les deux parties de la puce. La puce est ensuite traitée avec du (Tridecafluoro- 1,1,2,2-tetrahydrooctyl)trichlorosilane (5% v/v dans l'huile fluorée) pour rendre les canaux hydrophobes et les capillaires en PTFE sont insérées en entrées et sorties de puce et fixés avec de la colle epoxy pour assurer l'étanchéité. Une fois que la goutte contenant les cellules est insérée dans le canal principal grâce à la jonction T, elle est approchée de l'entrée du capillaire et une goutte de tampon de lyse est aspirée. La différence de vitesses de ces deux gouttes permet leur fusion rapide (Figure 46 méthode 1) et le reste du train de gouttes (solutions de lavage et d'élution) sont générés. Le reste du protocole est le même qu'avec le lysat cellulaire : les billes Oligo(dT) sont passées dans l'échantillon contenant les quelques cellules lysées et incubées 5 min à température ambiante, puis elles sont lavées par les deux solution de lavage successivement et relarguées dans la goutte d'eau qui est récupérée dans un tube pour l'analyse. Le deuxième train pour la capture de l'ADN est ensuite généré avec la goutte de billes AMPure qui est fusionnée (Figure 46 méthode 3) avec la goutte d'échantillon et les deux gouttes de lavage. Après la capture, pendant 5 min à température ambiante, les billes AMPure sont relarguées dans une goutte d'eau qui est récupérée pour l'analyse. La goutte de surnageant est aussi récupérée pour l'analyse et, comme avec le lysat cellulaire, elle est diluée par 10 préalablement à la PCR pour réduire la quantité d'inhibiteur présents dans le tampon de lyse.

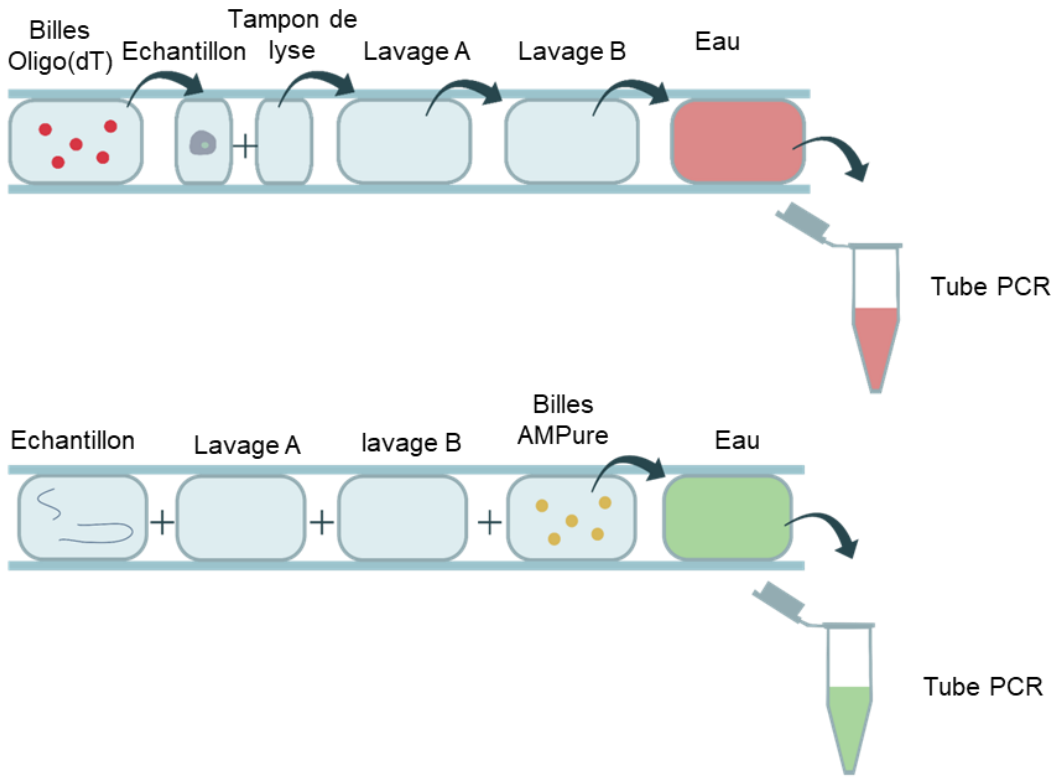


Figure 49 : Schéma du processus microfluidique. Les temps d'incubation pour les deux types de billes sont de cinq minutes à température ambiante.

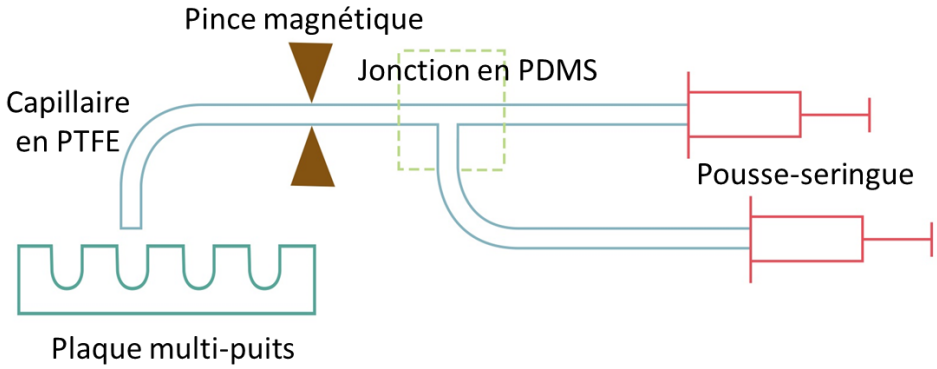


Figure 50 : Schéma de l'expérience. Une deuxième seringue et une jonction T en PDMS sont ajoutés pour insérer la goutte contenant des cellules entières dans le train de goutte permettant l'extraction de l'ARNm puis de l'ADN.

La jonction T en PDMS est positionnée sur le circuit microfluidique de sorte qu'elle ne soit jamais traversée par une goutte contenant du lysat cellulaire. En effet, nous avons remarqué lors d'expériences antérieures, réalisées par Ismail Hajji, que la tension de surface des gouttes contenant du lysat cellulaire est si faible qu'elles ont tendance à mouiller sur le PDMS malgré le traitement au trichlorosilane, ce qui pourrait induire des contaminations croisées entre gouttes. Les gouttes contenant du lysat cellulaire sont donc exclusivement transportées dans le capillaire en PTFE, dans lequel elles ne mouillent pas.

iii. Résultats

Les résultats des extractions sont montrés Figure 51. Les expériences ont été réalisées sur des gouttes contenant entre 3 et 7 cellules.

Dans le cas de l'ARNm (Figure 51 gauche), le taux moyen de capture sur les billes Oligo(dT) est de 34 %, ce qui est presque deux fois plus faible que sur le lysat d'une centaine de cellules en goutte (autour de 60%). Une explication de cette baisse pourrait être une lyse incomplète des cellules ou la dilution importante de l'ARNm à cause de la faible quantité de cellules. Dans ces deux cas, l'augmentation du temps de capture devrait permettre d'améliorer le taux de capture (la technique G&T-seq requiert 20 minutes de capture en tube [34]). Cependant, un allongement du temps d'incubation de 5 à 10 minutes n'a pas permis d'observer une augmentation significative du taux de capture (il augmente en moyenne seulement de 3% avec un écart type supérieur à 10%). Une autre hypothèse est que la présence de PBS dans la goutte contenant les cellules modifie la concentration en sel et perturbe l'efficacité de capture de l'ARNm par les billes Oligo(dT). Pour évaluer l'effet du PBS sur la capture, j'ai réalisé le protocole d'extraction sur du lysat cellulaire en tube en ajoutant la même proportion de PBS que celle utilisé pour l'extraction en goutte sur des cellules entières (soit 1/3 de PBS et 2/3 de tampon de lyse/capture). La comparaison avec la même extraction effectuée dans le tampon de lyse/capture sans PBS ne montre pas de différence significative sur le pourcentage d'ARNm extrait, ce qui indique que les conditions en solutions sont favorables à la capture de l'ARNm malgré la présence de PBS.

Pour l'ADN (Figure 51 droite), le pourcentage d'extraction par les billes AMPure est de 53% en moyenne, ce qui est proche de ce qui a été obtenu sur le lysat cellulaire en goutte et le mélange d'ADN et d'ARN pré-purifiés. L'écart type très important (40 %) peut être expliqué par le faible nombre de cellules en goutte et donc le nombre réduit de copie de l'ADN portant la séquence amplifiée par l'essai de qPCR, ce qui favorise l'obtention de valeurs extrêmales des pourcentages. De plus, à cause du faible nombre de copies d'ADN, la quantité présente dans le

surnageant peut être sous-évaluée car celui-ci est toujours dilué par dix pour réduire la présence d'inhibiteurs de la PCR, et donc la quantité d'ADN à amplifier peut être trop faible pour être détectable par qPCR.

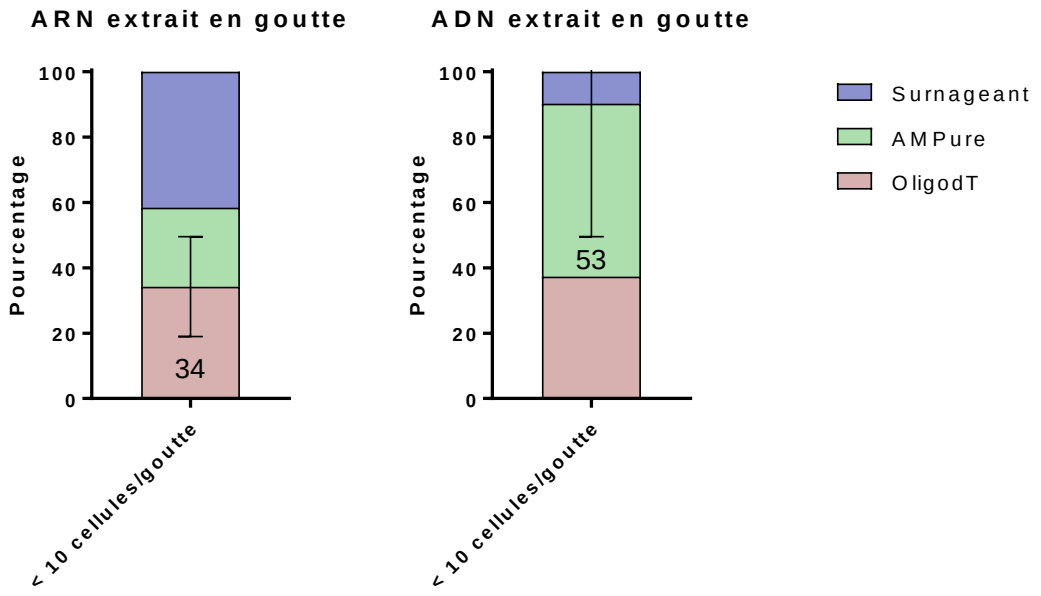


Figure 51 : Pourcentage de la quantité d'ARNm (à gauche) ou d'ADN (à droite) mesurée dans chacune des gouttes. Les barres d'erreur sont l'écart type pour la quantité capturée par les billes Oligo(dT) pour l'ARNm et par les billes AMPure pour l'ADN. Les extractions ont été effectuées dix fois pour la quantification de l'ARNm et cinq fois pour celle de l'ADN.

Ces résultats sont très prometteurs car ils démontrent pour la première fois dans un tel dispositif la séparation séquentielle de l'ADN et de l'ARNm à partir de moins d'une dizaine de cellules entières encapsulées et lysées en gouttes. Néanmoins, une investigation plus poussée sur les conditions de capture devrait permettre d'augmenter le pourcentage d'ARNm capturé sur les billes Oligo(dT), et nous approchons de la limite de notre méthode de quantification pour l'ADN à cause de la très faible concentration de matériel génétique présent dans l'échantillon. Une nouvelle étape pour valider l'intégrité du matériel génomique et transcriptomique extrait serait de procéder à leur séquençage.

IV. Conclusion et perspectives

Nous avons présenté le développement d'un système de microfluidique de gouttes permettant l'extraction et la séparation de l'ADN et l'ARNm à partir de quelques cellules encapsulées en gouttes. Pour la séparation, nous avons utilisé la technologie des pinces magnétiques développée dans notre laboratoire, qui permet de transférer efficacement des billes magnétiques d'une goutte à l'autre pour effectuer des protocoles bioanalytiques avec un très bon taux de purification et de façon automatisable. Nous avons basé nos expériences sur des protocoles de bioanalyse non-microfluidique récemment développés pour l'analyse multi-omique qui permettent d'extraire l'ARNm et l'ADN sur des billes magnétiques à partir de cellules uniques.

Afin de caractériser les performances d'extraction de notre système, nous avons réalisé deux types d'essais (RT)-qPCR qui nous permettent de quantifier exclusivement l'ADNg ou l'ARNm présents dans les solutions obtenues après la séparation.

Pour optimiser et valider la faisabilité de notre approche dont l'objectif est la séparation physique de l'ADNg et l'ARNm en goutte sur des cellules uniques, nous avons procédé en augmentant graduellement la complexité de l'échantillon. Nous avons tout d'abord commencé par extraire l'ADN et l'ARNm à partir d'un mélange d'ADN et d'ARN pré-purifiés. Ensuite les extractions ont été effectuées sur des lysats cellulaires préparés en tube puis directement sur des gouttes contenant moins de dix cellules. A chaque étape, les performances du système en gouttes ont été évaluées et les résultats comparés avec les extractions effectuées en tubes de manière non microfluidique. Cette progression étape par étape nous a permis de nous confronter et répondre progressivement aux nouvelles problématiques posées par la complexification de l'échantillon, notamment concernant la fusion passive des gouttes dans le capillaire. Les résultats obtenus sont prometteurs car ils démontrent pour la première fois dans un tel dispositif la séparation séquentielle de l'ADN et de l'ARNm à partir de lysat cellulaire et de quelques cellules entières encapsulées et lysées en gouttes. Pour démontrer l'intégrité des informations génomiques et transcriptomiques séparées par cette méthode, nous envisageons de faire du séquençage sur le matériel génomique et transcriptomique extrait en gouttes.

L'objectif de notre système est d'effectuer la séparation du génome et du transcriptome sur des cellules uniques. Nous avons montré que cela est faisable sur quelques cellules et nous pensons que ce protocole peut être appliqué sans changements majeurs sur des cellules uniques. La principale modification à apporter pour cela est d'encapsuler en amont des cellules uniques

dans des gouttes dont la taille est compatible avec les dimensions des capillaires utilisés (typiquement 100 nL). Or les systèmes qui sont usuels actuellement pour l'encapsulation de cellules en gouttes permettent de générer des gouttes beaucoup plus petites (de l'ordre de 100 pL) et la présence ou non de cellules dans les gouttes formées dépend d'une loi de Poisson. Il faut donc ensuite trier les gouttes contenant des cellules pour éliminer les gouttes vides [44] [45] ou avoir la capacité d'analyser un très grand nombre de gouttes [46], ce qui n'est pas le cas dans notre système. La différence de tailles entre les gouttes obtenues par les techniques de microfluidique de gouttes pour l'encapsulation de cellules uniques et celles manipulés dans notre système est limitante pour l'association de différents outils microfluidiques et la fusion de deux gouttes picolitrique et nanolitrique s'est révélée être délicate pour des raisons de synchronisation et de résistance hydrodynamique principalement [39].

De plus, pour que notre système soit véritablement exploitable pour les applications actuelles en bioanalyse, il faudrait augmenter le débit pour pouvoir traiter un nombre intéressant de cellules. Par exemple, paralléliser les opérations effectuées dans le capillaire devrait permettre d'augmenter le débit pour le traitement de quelques dizaines de cellules (pour des échantillons rares comme des cellules tumorales circulantes).

Pour atteindre des débits vraiment plus importants et étudier des populations de cellules d'un tissu par exemple, il est nécessaire de réduire la taille des gouttes sur lesquelles nous travaillons. C'est la raison pour laquelle Simon Dumas a travaillé sur la miniaturisation des pinces magnétiques sur une puce qui permet d'effectuer des extractions de particules magnétiques efficaces sur des gouttes de 100 pL à un débit de 10 Hz environ [31]. La miniaturisation résout aussi le problème de l'encapsulation de cellules uniques en gouttes mais pose de nouveaux défis comme l'indexation des gouttes qui ne peuvent plus être simplement repérées par leur position dans un train de gouttes. Le travail présenté dans ce chapitre pourra être utilisé pour l'adaptation de protocoles d'extractions dans ce nouveau système.

Bibliographie

[1] S. Chen, B. B. Lake et K. Zhang, «High-throughput sequencing of the transcriptome and chromatin accessibility in the same cell,» *Nature Biotechnology,* vol. 37, pp. 1452-1457, 2019.

[2] P. Liu, P. Jonkheijm, L. W. M. M. Terstappen et M. Stevens, «Magnetic particles for CTC enrichment,» *Cancers,* vol. 12, 2020.

[3] K. Turcheniuk, A. V. Tarasevych, V. P. Kukhar, R. Boukherroub et S. Szunerits, «Recent advances in surface chemistry strategies for the fabrication of functional iron oxide based magnetic nanoparticles,» *Nanoscale,* vol. 5, pp. 10729-10752, 2013.

[4] B. Teste, F. Kanoufi, S. Descroix, P. Ponncet, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, J. Petr, A. Varenne et M.-C. Hennion, «Kinetic analyses and performance of a colloidal magnetic nanoparticle based immunoassay dedicated to allergy diagnosis,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* vol. 400, pp. 3395-3407, 2011.

[5] A. Ali-Cherif, S. Begolo, S. Descroix, J.-L. Viovy et L. Malaquin, «Programmable magnetic tweezers and droplet microfluidic device for high-throughput nanoliter multi-step assays,» *Angewandte Chemie,* vol. 51, pp. 10765-10769, 2012.

[6] P. J. Tighe, R. R. Ryder, I. Todd et L. C. Fairclough, «ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls,» *Proteomics - Clinical Applications,* vol. 9, pp. 406-422, 2015.

[7] M. Serra, D. Ferraro, I. Pereiro, J.-L. Viovy et S. Descroix, «The power of solid supports in multiphase and droplet-based microfluidics: towards clinical applications,» *Lab on a Chip,* vol. 17, pp. 3979-3999, 2017.

[8] E. AlHetlani, O. J. Hatt, M. Vojtisek, M. D. Tarn et N. Pamme, «Magnetic droplets - Generation and manipulation in continuous flow,» *14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 2010, MicroTAS 2010,* vol. 3, pp. 1817-1819, 2010.

[9] D. Lombardi et P. S. Dittrich, «Droplet microfluidics with magnetic beads: A new tool to investigate drug-protein interactions,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* vol. 399, pp. 347-352, 2011.

[10] X. Pan, S. Zeng, Q. Zhang, B. Lin et J. Qin, «Sequential microfluidic droplet processing for rapid DNA extraction,» *Electrophoresis,* vol. 32, pp. 3399-3405, 2011.

[11] R. Gao, Z. Cheng, A. J. deMello et J. Choo, «Wash-free magnetic immunoassay of the PSA cancer marker using SERS and droplet microfluidics,» *Lab on a Chip,* vol. 16, pp. 1022-1029, 2016.

[12] H. Lee, L. Xu et K. W. Oh, «Droplet-based microfluidic washing module for magnetic particle-based assays,» *Biomicrofluidics,* vol. 8, 2014.

[13] E. Brouzes, T. Kruse, R. Kimmerling et H. H. Strey, «Rapid and continuous magnetic separation in droplet microfluidic devices,» *Lab on a Chip,* vol. 15, pp. 908-919, 2015.

[14] B. Verbruggen, K. Leirs, R. Puers et J. Lammertyn, «Selective DNA extraction with microparticles in segmented flow,» *Microfluidics and Nanofluidics,* pp. 293-303, 2014.

[15] S.-Q. Gu, Y.-X. Zhang, W.-B. Du, B. Yao et Q. Fang, «Multifunctional picoliter droplet manipulation platform and its application in single cell analysis,» *Analytical chemistry,* vol. 83, pp. 7570-7576, 2011.

[16] L. Metzler, U. Rehbein, J.-N. Schönberg, T. Brandstetter, K. Thedieck et J. Rühe, «Breaking the interface: efficient extraction of magnetic beads from nanoliter-droplets for automated sequential immunoassays,» *Analytical Chemistry,* vol. 92, pp. 10283-10290, 2020.

[17] Y. Fouillet, D. Jary, C. Chabrol, P. Claustre et C. Peponnet, «Digital microfluidic design and optimization of classic and new fluidic functions for lab on a chip systems,» *Microfluidics and Nanofluidics,* vol. 4, pp. 159-165, 2008.

[18] R. S. Sista, A. E. Eckhardt, V. Srinivasan, M. G. Pollack, S. Palanki et V. K. Pamula, «Heterogeneous immunoassays using magnetic beads on a digital microfluidic platform,» *Lab on a Chip,* vol. 8, pp. 2188-2196, 2008.

[19] N. Vergauwe, D. Witters, F. Ceyssens, S. Vermeir, B. Verbruggen, R. Puers et J. Lammertyn, «A versatile electrowetting-based digital microfluidic platform for quantitative homogeneous and heterogeneous bio-assays,» *Journal of Micromechanics and Microengineering,* vol. 21, 2011.

[20] L. Coudron, M. B. McDonnell, I. Munro, D. K. McCluskey, I. D. Johnston, C. K. L. Tan et M. C. Tracey, «Fully integrated digital microfluidics platform for automated immunoassay; a versatile tool for rapid, specific detection of a wide range of pathogens,» *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 128, pp. 52-60, 2019.

[21] A. Rival, D. Jary, C. Delattre, Y. Fouillet, G. Castellan, A. Bellemin-Comte et X. Gidrol, «An EWOD-based microfluidic chip for single-cell isolation, mRNA purification and subsequent multiplex qPCR,» *Lab on a Chip,* vol. 14, pp. 3739-3749, 214.

[22] H. Kim, M. J. Jebrail, A. Sinha, Z. W. Bent, O. D. Solberg, K. P. Williams, S. A. Langevin, R. F. Renzi, J. L. Van de Vreugde, R. J. Meagher, J. S. Schoeniger, T. W. Lane, S. S. Branda, M. S. Bartsch et K. D. Patel, «A Microfluidic DNA Library Preparation Platform for Next-Generation Sequencing,» *PLoS ONE,* vol. 8, 2013.

[23] D. Ferraro, J. Champ, B. Teste, M. Serra, L. Malaquin, J.-L. Viovy, P. de Cremoux et S. Descroix, «Microfluidic platform combining droplets and magnetic tweezers: application to HER2 expression in cancer diagnosis,» *Scientific Reports,* vol. 6, 2016.

[24] A. Ali-Cherif, Développement de nouvelles méthodes bioanalytiques en microfluidique : de l'immunodosage en goutte au nez artificiel, Thèse de doctorat de l'Université Paris 6, 2011.

[25] B. Teste, A. Ali-Chérif, J.-L. Viovy et L. Malaquin, «A low cost and high throughput magnetic bead-based immuno-agglutination assay in confined droplets,» *Lab on a Chip,* vol. 13, pp. 2344-2349, 2013.

[26] B. Teste, J. L.-V. A. Champ, S. M. L. Descroix, J.-L. Viovy, I. Draskovic et G. Motte, «Chromatin immunoprecipitation in microfluidic droplets: towards fast and cheap analyses,» *Lab on a Chip,* vol. 17, pp. 530-537, 2017.

[27] T. D. Mai, D. Ferraro, N. Aboud, R. Renault, M. Serra, N. T. Tran, J.-L. Viovy, C. Smadja, S. Descroix et M. Taverna, «Single-step immunoassays and microfluidic droplet operation: towards a versatile approach for detection of amyloid-β peptide-based biomarkers of Alzheimer's disease,» *Sensors and Actuators,* vol. 255, pp. 2126-2135, 2018.

[28] M. Serra, An innovative approach for magnetic solid supports handling in droplet microfluidics, Thèse de doctorat de l'Université PSL, 2018.

[29] M. Serra, E. Gontran, I. Hajji, L. Malaquin, J.-L. Viovy, S. Descroix et D. Ferraro, «Development of a droplet microfluidics device based on integrated soft magnets and fluidic capacitor for passive extraction and redispersion of functionalized magnetic particles,» *Advanced Materials Technologies,* vol. 5, 2020.

[30] M. Serra, T. D. Mai, A. L. Serra, M.-C. Nguyen, A. Eisele, L. Perié, J.-L. Viovy, D. Ferraro et S. Descroix, «Integrated droplet microfluidic device for magnetic particles handling: application to DNA size selection in NGS libraries preparation,» *Sensors and Actuators,* vol. 305, 2020.

[31] S. Dumas, Micro-Magnetic-Tweezers : an innovative tool for high-throughput bioseparation in droplet microfluidics, Thèse de doctorat de Sorbonne Université, 2020.

[32] I. C. Macaulay, C. P. Ponting et T. Voet, «Single-cell multiomics : multiple measurements from single cells,» *Trends in Genetics,* vol. 33, pp. 155-168, 2017.

[33] I. C. Macauley, W. Haerty, P. Kumar, Y. I. Li, T. Xiaoming Hu, M. J. Teng, M. Goolam, N. Saurat, P. Coupland, L. M. Shirley, M. Smith, N. Van der Aa, R. Barnejee, P. D. Ellis, M. A. Quail et e. al, «G&t-seq: parallel sequencing of single- cell genomes and transcriptomes,» *Nature Methods,* vol. 12, pp. 519-522, 2015.

[34] I. C. Macaulay, M. J. Teng, W. Hearty, P. P. C. P. Kumar et T. Voet, «Separation and parallel sequencing of the genomes and transcriptomes of single cells using G&T-seq,» *Nature Protocol,* vol. 11, pp. 2081-2103, 2016.

[35] S. Bustin et J. Huggett, «qPCR primer design revisited,» *Biomolecular Detection and Quantification,* vol. 14, pp. 19-28, 2017.

[36] M. Botes, M. de Kwaadsteniet et T. E. Cloete, «Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* vol. 405, pp. 91-108, 2013.

[37] D. Proudnikov, V. Yuferov, Y. Zhou, K. S. LaForge, A. Ho et M. J. Kreek, «Optimizing primer-probe design for fluorescent PCR,» *Journal of Neuroscience Methods,* vol. 123, pp. 31-45, 2003.

[38] Y. Nakayama, H. Yamaguchi, N. Einaga et M. Esumi, «Pitfalls of DNA quantification using dnabinding fluorescent dyes and suggested solutions,» *PLos ONE,* vol. 11, 2016.

[39] I. Hajji, Exploring the dynamics of cancer cell subpopulations and metastatic invasion using high throughput microfluidic, Thèse de doctorat de l'université PSL, 2019.

[40] C. N. Baroud, F. Gallaire et R. Dangla, «Dynamics of microfluidic droplets Charles,» *Lab on a Chip,* vol. 10, pp. 2032-2045, 2010.

[41] D. Ferraro, M. Serra, D. Filippi, L. Zago, E. Guglielmin, M. Pierno, S. Descroix, J.-L. Viovy et G. Mistura, «Controlling the distance of highly confined droplets in a capillary by interfacial tension for merging on-demand,» *Lab on a Chip,* vol. 19, pp. 136-146, 2019.

[42] M. Sidstect, P. Radström et J. Hedman, «PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* vol. 412, pp. 2009-2023, 2020.

[43] L. Boiso et J. Hedman, «Overcoming sodium dodecyl sulfate induced PCR inhibition,» *Forensic Science International: Genetics,* vol. 29, 2017.

[44] M. Chabert et J.-L. Viovy, «Microfluidic high-throughput encapsulation and,» *PNAS,* vol. 105, pp. 3191-3196, 2008.

[45] M. Sesen et G. Whyte, «Image-based single cell sorting automation in droplet microfluidics,» *Scientific Reports,* vol. 10, 2020.

[46] E. Z. Macosko, A. Basu, R. Satija, J. Nemesh, K. Shekhar, M. Goldman, I. Tirosh, A. R. Bialas, N. Kamitaki, E. M. Marstersteck, J. J. Trombetta, D. A. Weitz, J. R. Sanes, A. K. Shalek, A. Regev et S. A. McCarrol, «Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets,» *Cell,* vol. 161, pp. 1202-1214, 2015.

Chapitre 3 - Préparation d'échantillons en gouttes pour la spectrométrie de masse MALDI-TOF

Dans ce chapitre, je présente le deuxième projet sur lequel j'ai travaillé pendant ma thèse concernant la préparation d'échantillons en gouttes pour la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ce projet a été initié entre notre équipe, avec notamment Marco Serra, alors post-doctorant, qui m'a aidé à mettre en place le système de microfluidique pour débuter les expériences, et Sarah Bregant et Florent Malloggi, du CEA Saclay, qui ont apporté leurs expertises respectivement sur la spectrométrie de masse et les recirculations de Marangoni en goutte. Joëlle Vinh et Emmanuelle Demey, de l'équipe Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique de l'ESPCI, nous ont ensuite rejoints pour apporter un support technique et également leur expertise en spectrométrie de masse. Je remercie particulièrement Emmanuelle pour les joyeux après-midi passés à acquérir les spectres de masse ensemble et sa patience pour répondre à mes questions de novice en spectrométrie de masse.

Dans une première partie, j'expose l'intérêt de notre projet de couplage de spectrométrie de masse MALDI-TOF avec la microfluidique de gouttes, en présentant notamment l'effet de concentration de cristaux initialement observé par nos collaborateurs du CEA et l'intérêt de la digestion en gouttes sur billes magnétiques. Je décris ensuite le protocole expérimental mis en place ainsi que les différents paramètres optimisés. Enfin, je présente les résultats obtenus et les perspectives de ce travail.

I. Couplage de la spectrométrie de masse MALDI-TOF et de la microfluidique de gouttes

1. Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique utilisée pour mesurer le rapport masse sur charge d'espèces ionisées. Elle permet d'identifier et détecter des peptides, des polymères, des protéines et des complexes de protéines. Les avantages de la spectrométrie de masse par rapport à d'autres techniques sont une détection sensible et sans recours à des marquages et la possibilité d'identifier des structures chimiques. La spectrométrie de masse est devenue l'une des techniques analytiques les plus puissantes à disposition des chercheurs et est largement adoptée dans différents domaines dont la synthèse chimique, la biologie moléculaire, la biomédecine, l'alimentation et l'environnement [1].

Il existe différentes méthodes de spectrométrie de masse, notamment en fonction du mode d'ionisation des espèces, parmi celles-ci, la spectrométrie de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) est une technique amplement utilisée dans laquelle une impulsion laser volatilise et ionise l'analyte co-cristallisé avec une matrice acide et déposé sur une plaque en métal. La matrice acide sert de source de protons pour l'ionisation et absorbe l'énergie du laser efficacement pour la volatilisation de l'échantillon (Figure 52). Comparée à la ESI-MS (ionisation par électrospray, voir Chapitre 1 partie III), la MALDI-MS est plus tolérante aux sels et aux autres contaminants d'échantillons, offre de très bonnes limites de détection et produit des spectres de masse qui sont relativement faciles à interpréter grâce à l'absence de charges multiples présentes dans la ESI-MS [2]. De plus, la MALDI-MS peut être appliquée à une grande gamme de poids moléculaire, avec une bonne sensibilité à plus de 300 kDa, contre moins de 100 kDa pour la ESI-MS, ce qui permet l'analyse de peptides et de protéines entières. Quand les molécules sont ionisées et volatilisées, la méthode TOF mesure un temps de vol (Time Of Flight). Les ions sont accélérés par un champ électrique et le temps qu'ils mettent pour atteindre le détecteur dépend de leur rapport masse/charge.

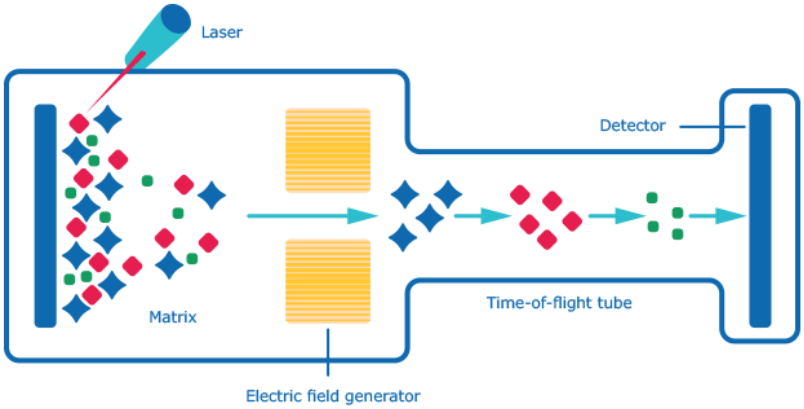


Figure 52 : Schéma du principe de la MALDI-TOF MS. L'échantillon co-cristallisé avec la matrice est ionisé et volatilisé grâce à un laser. Les ions sont ensuite accélérés avec un champ électrique jusqu'au détecteur. Source : www.sigmaaldrich.com

Les appareils qui ont été utilisés pour réaliser les expériences présentées dans ce chapitre sont les spectromètre 4800 MALDI-TOF/TOF et le 5800 MALDI-TOF/TOF de Applied Biosystems. Les interrogations de spectres pour identifier les protéines présentes dans l'échantillon à partir de l'empreinte en masse des peptides ont été faites avec le logiciel Protein Pilot et la base de données MASCOT. La tolérance maximale en masse a été fixée à 50 ppm et les oxydations de méthionine et déamidations ont été choisies comme modifications variables. Les analyses au spectromètre et l'extraction des données brutes ont été faites principalement par Sarah Bregant (CEA) et Emmanuelle Demey (ESPCI). Les échantillons ont été déposés sur une plaque MALDI Opti-TOF 384 puits de Applied Biosystems. La matrice utilisée est de l'acide α-Cyano-4-hydroxy-cinnamic (HCCA) de Fluka.

Un prétraitement de l'échantillon, tel que la digestion enzymatique, le dessalage ou la pré-concentration des analytes d'intérêt, est souvent nécessaire pour une analyse par spectrométrie de masse efficace. En particulier, une digestion efficace des protéines entières est une étape souvent indispensable pour l'identification rapide et précise des protéines par l'empreinte en masse des peptides. La trypsine est l'enzyme la plus couramment utilisée pour la digestion pour la spectrométrie de masse à cause de son efficacité élevée, sa spécificité et sa large disponibilité à un coût raisonnable. La digestion tryptique peut être complétée ou remplacée selon la nature de l'échantillon par d'autres protéases telles que la chymotrypsine ou la lysC qui possèdent des spécificités distinctes et donc génèrent des ensembles de fragments (peptides) différents [3]. Pour les expériences présentées dans ce chapitre, nous avons donc choisi de travailler avec la trypsine, qui sépare les protéines en peptides de taille moyenne de 700 à 2000 Da de manière reproductible, au niveau des résidus arginine et lysine. Ainsi, l'identification de la protéine digérée peut se faire en identifiant le spectre obtenu après digestion, sur lequel apparaissent les différents

peptides, avec un spectre théorique généré à partir des banques de données sur les protéines. Cependant, cette étape d'identification peut être compromise par l'autolyse de la trypsine, qui génère des peptides qui peuvent s'ajouter sur le spectre de masse et rendre l'identification plus difficile. Une méthode pour réduire l'autolyse de la trypsine est de la greffer sur un support solide comme les monolithes ou des microbilles, ce qui permet aussi d'augmenter la longévité des enzymes immobilisées. Ces types de système, appelés « IMER » (immobilized enzyme reactors), sont de plus en plus miniaturisés pour réduire les volumes et les temps de digestion et les intégrer à un processus microfluidique [4]. Par exemple, Wei et al [5] ont intégré dans un même système le fractionnement de protéines, leur dénaturation et digestion sur IMER monolithique et l'enrichissement en peptides. L'usage de microbilles comme support pour l'immobilisation est aussi assez répandu et en général plus aisé à mettre en œuvre que la réalisation d'un support monolithique dans un canal microfluidique. Ces billes peuvent être compactées spatialement dans une microchambre [6], ou être retenues dans un microcanal par une force magnétique externe si elles sont magnétiques [7]. Comme présenté dans le Chapitre 1 partie III, les avantages des billes magnétiques par rapport à d'autres supports solides sont qu'elles sont facilement manipulables grâce à un champ magnétique externe et qu'elles offrent un bon rapport surface/volume, ce qui peut augmenter l'efficacité de la digestion.

2. Avantage d'un couplage avec la microfluidique de gouttes

La technique d'ionisation pour la spectrométrie de masse la plus populaire pour le couplage avec la microfluidique de goutte est l'ionisation par électrospray (ESI), décrite dans le Chapitre 1 partie III. Un des plus gros défis du couplage de la spectrométrie de masse par ESI avec la microfluidique de gouttes est l'interférence de l'huile avec le procédé d'ionisation. Différentes techniques sont développées pour éviter cela, comme le fait de désaxer la pointe émettrice et le récepteur pour que l'huile, non chargée, n'atteigne pas le récepteur [8]. Un avantage majeur de l'ESI-MS par rapport au MALDI-MS est que les émetteurs ESI peuvent être fabriqués sur les puces microfluidiques de génération de gouttes, ce qui permet une détection de gouttes à haut débit et de grande sensibilité [9]. En revanche, la MALDI-MS comme mentionné précédemment est plus tolérante aux sels et aux autres contaminants d'échantillons, offre de très bonnes limites de détection et produit des spectres de masse qui sont relativement faciles à interpréter grâce à l'absence de charges multiples présentes dans la ESI-MS [2]. La première preuve de concept pour intégrer la MALDI-TOF MS avec la microfluidique de gouttes a été montrée en 2006 [10] pour

l'analyse de substances dérivées de plante toxiques. Dans cette étude, le système microfluidique est une jonction T qui permet d'ajouter une solution de substrat à des gouttes de 15 nL contenant les réactifs. Ces gouttes sont directement déposées sur une plaque MALDI, évaporées, et la matrice est déposée ensuite. Le groupe de Petra Dittrich a été le premier à utiliser la MALDI-MS pour l'analyse de gouttes à haut débit [11]. Des gouttes de 3 nL contenant l'échantillon à analyser sont générées par une jonction T et sont déposées de façon automatisée sur une plaque contenant plus de 26 000 emplacements hydrophiles. La matrice est ajoutée en spray une fois que l'huile est évaporée. Pereira et al [12] ont développé un système intégré qui permet de séparer des analytes sur colonnes nano-LC, puis de les mélanger avec la matrice avant de les déposer en gouttes sur une plaque MALDI standard. Cependant, pour la phase continue ils utilisent une huile peu volatile qui, lorsqu'elle est déposée avec les gouttes sur la plaque, empêche la phase liquide de s'évaporer du mélange échantillon/matrice et retarde la cristallisation de la matrice. Ils observent alors l'apparition de bulles gazeuses entre la couche d'huile et la matrice et la concentration de l'analyte sur le contour de la goutte, ce qui rend la détection difficile. Pour remédier à cela, ils utilisent une technique avec une membrane oléophile pour enlever l'huile à la sortie du capillaire et ne conserver que les gouttes sans huile.

Le couplage de la spectrométrie de masse avec la microfluidique de gouttes présente les avantages connus de la microfluidique de gouttes tels que la miniaturisation des volumes de réaction, la réduction de l'adsorption non spécifique de protéines/peptides sur les parois du tube et l'automatisation du processus. De plus, Sarah Bregant et Florent Malloggi, avec qui nous avons collaboré pour les expériences présentées dans ce chapitre, ont montré récemment qu'un avantage supplémentaire peut émerger en contrôlant l'étape de dépôt de l'échantillon en gouttes sur une plaque MALDI [13]. En effet, lorsque l'échantillon mélangé à la matrice est déposé sous forme de gouttes entourées par une huile fluorée contenant un tensioactif, la matrice co-cristallisée avec l'échantillon apparait concentrée localement une fois le dépôt sec, ce qui permet d'augmenter l'intensité du signal détecté par un facteur 30 dans le cas rapporté dans leurs travaux [13] (Figure 53).

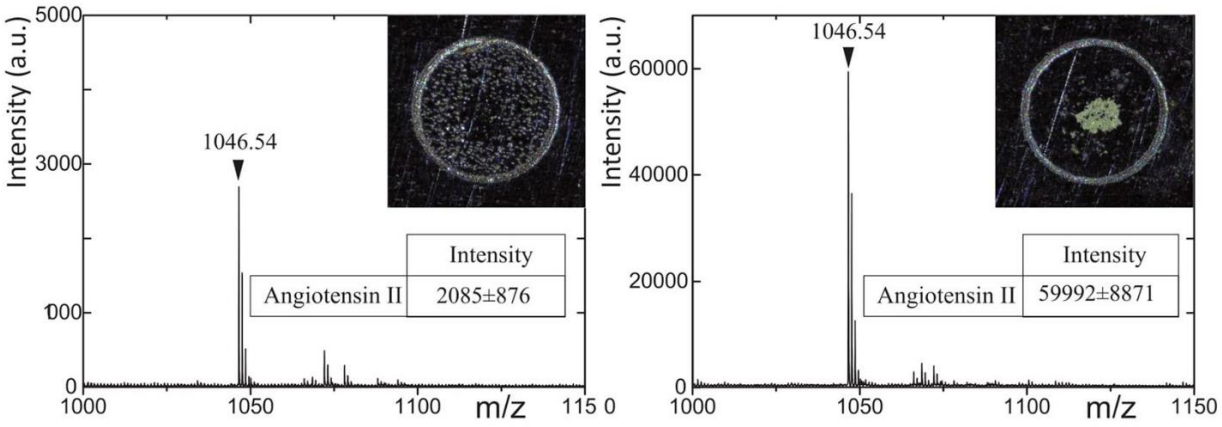


Figure 53 : Spectres MALDI MS de l'angiotensine II à 5 femtomoles. Gauche : dépôt standard à la pipette. Droite : dépôt en gouttes. Les inserts sont des photos de la co-cristallisation de la matrice avec l'analyte : celui avec le dépôt en gouttes apparaît bien plus concentré que celui avec le dépôt standard. [13]

Cette concentration locale de l'échantillon semble être due à des flux de recirculation à l'intérieur de la goutte déposée sur la plaque qui seraient provoqués par une différence de tension de surface entre le haut et le bas de la goutte. Ce phénomène de transport de matière le long d'une interface sous l'effet d'un gradient de tension de surface est appelé effet Marangoni (Figure 54).

Dans le cas d'une goutte déposée avec de l'huile sur une plaque, plusieurs effets entrent en jeu simultanément, ce qui rend non triviales la compréhension et modélisation de ce phénomène. En effet, les recirculations apparaissent lors de l'évaporation de la goutte, ce qui en fait un système dynamique avec plusieurs paramètres. La goutte étant composée d'un mélange eau/acétonitrile avec un ratio 75/25 (v/v), sa composition varie au cours de l'évaporation car l'acétonitrile est plus volatile que l'eau (

Table 1). Sa composition peut aussi être modifiée localement avec une concentration plus élevée en eau là où l'acétonitrile s'évapore le plus, c'est à dire proche de l'interface goutte/air, et donc la tension de surface de la goutte, qui dépend de sa composition, est aussi modifiée localement. De plus, nos collaborateurs ont montré que la présence d'huile et de tensioactif est nécessaire à l'apparition de l'effet de concentration locale de l'échantillon. L'influence de la concentration en tensioactif et du type d'huile sera discutée dans la partie suivante. L'huile est supposée avoir un double rôle : elle ralentit l'évaporation de la goutte hydro-organique en l'isolant de l'air et elle modifie la tension de surface localement avec l'apport de tensioactif. Comme l'huile s'évapore aussi, tous ces effets sont dynamiques sur un temps de l'ordre de la minute. Un paramètre supplémentaire qui peut augmenter cet effet de concentration est le fait que la matrice HCCA n'est pas soluble dans l'eau. Ainsi, au cours de l'évaporation de l'acétonitrile et de l'enrichissement en eau de la goutte, la matrice co-cristallise avec les peptides et lorsque, à cause

des recirculations de Marangoni, ces cristaux se trouvent proches de l'interface plaque/eau, ils ont tendance à rester sur la plaque, ce qui est plus favorable que d'être dans le volume d'eau. Tous ces effets contribuent à expliquer pourquoi les cristaux s'accumulent au centre de la goutte dans certaines conditions.

	Eau	Acétonitrile
Pression de vapeur saturante à 25°C (kPa)	3,2	13,3
Tension de surface (10^{-3} N.m^{-1})	72	29

Table 1 : Valeurs de la pression de vapeur saturante de l'eau et de l'acétonitrile à 25°C (plus celle-ci est importante, plus l'espèce est volatile) et de leur tension de surface avec l'air. Source : CHERIC database, Pure component properties.

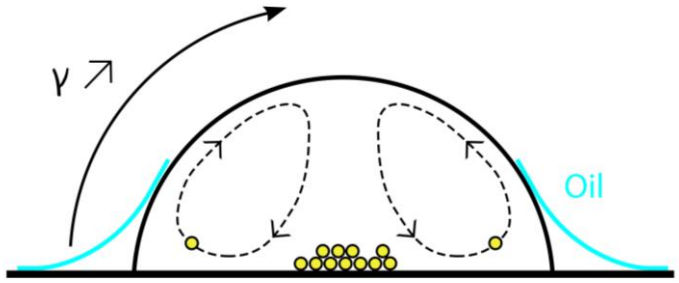


Figure 54 : Schéma des recirculation de Marangoni dans la goutte. γ représente la tension de surface qui est supposée être plus importante en haut qu'en bas de la goutte.

Les expériences effectuées par nos collaborateurs au CEA ont montré un nouvel intérêt du couplage de la microfluidique de goutte avec la MALDI-TOF MS qui est la pré-concentration de l'échantillon après dépôt sur plaque. Cependant, utiliser la microfluidique de goutte seulement pour déposer des échantillons sur plaque est assez limité comparé à l'énorme potentiel de celle-ci. C'est pourquoi, dans ce projet, nous avons cherché à intégrer une étape supplémentaire au processus de préparation d'échantillon qui est la digestion enzymatique en gouttes.

II. Développement du protocole expérimental

1. Le processus microfluidique

L'approche choisie ici est la digestion enzymatique en goutte d'un échantillon composé d'une protéine modèle, le lysozyme, grâce à des billes magnétiques greffées avec de la trypsine. Grâce à son immobilisation sur les billes magnétiques, la trypsine peut être déplacée à souhait d'une goutte à l'autre avec la pince magnétique, ce qui permet notamment de la retirer de l'échantillon avant l'analyse. Après la digestion, une goutte de matrice peut être ajoutée à la goutte d'échantillon et les deux sont déposées sur la plaque MALDI, entourées d'huile. Ainsi, l'échantillon et la matrice co-cristallise sur la plaque, alors que l'huile s'évapore, créant l'effet de concentration des cristaux. Les développements expérimentaux nécessaires à ce processus sont décrits dans cette partie.

i. Génération du train de gouttes

Un avantage du système microfluidique utilisé ici est qu'il est simple et ne nécessite pas de microfabrication. Des gouttes de 200 nL sont générées dans un capillaire fluoré grâce au pipetage séquentiel de solutions aqueuses et d'huile fluorée placées dans une plaque multi-puits. Le capillaire, de diamètre interne de 300µm et externe de 600µm, est en PTFE, un matériau hydrophobe et mouillant pour l'huile fluorée, ce qui permet la formation de gouttes de forme allongée entourées d'huile et d'un film de lubrification qui limite la contamination avec la paroi du capillaire et qui permet aux gouttes générées de rester dans l'ordre de production sans aucun chevauchement ou changement de cet ordre déterministe possible. Le débit de la phase continue dans le capillaire est appliqué par un pousse-seringue (Nemesys, Cetoni) et le positionnement de l'extrémité du capillaire est ajusté avec un bras robot (Rotaxys, Cetoni). Ceux-ci sont contrôlés et programmés grâce au logiciel QmixElements de Cetoni. Le capillaire est positionné entre les pointes de la pince magnétique pour l'extraction et la redispersion des billes fonctionnalisées. Une partie du capillaire est aussi introduite dans une plaque usinée en laiton déposée sur une plaque chauffante pour avoir une température de 50°C dans le capillaire lors de la digestion enzymatique (Figure 55). Lors du dépôt de l'échantillon et de la matrice, décrit par la suite, une plaque MALDI

est insérée à la place de la plaque multi-puits et le bras robot ainsi que le pousse seringue sont utilisés pour déposer les gouttes de manière contrôlée.

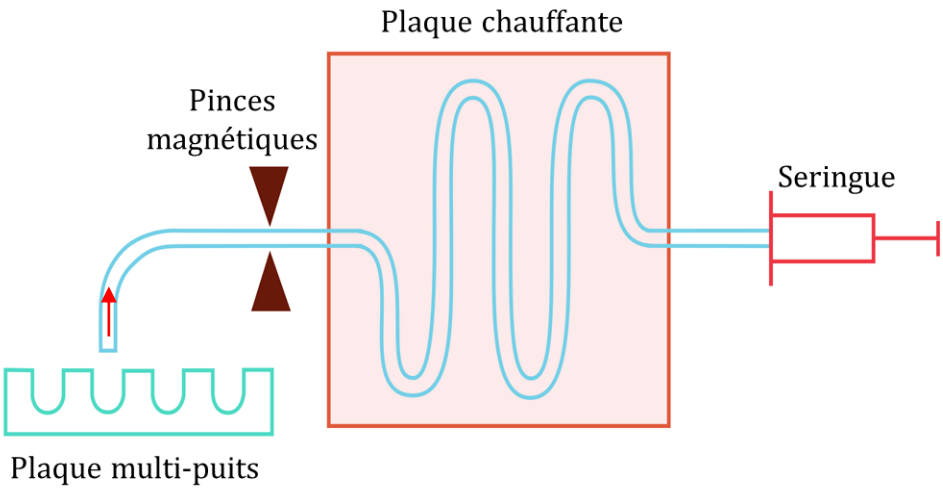


Figure 55 : Schéma de l'expérience. La flèche rouge représente le sens du flux pendant le pipetage.

ii. Manipulations microfluidiques

Le train de gouttes est composé au départ de deux gouttes de 200 nL par analyse : une goutte contenant la solution de billes magnétiques fonctionnalisées avec de la trypsine pour la digestion et une goutte contenant l'échantillon de protéines à digérer (Figure 56). La goutte d'échantillon est composée de lysozyme à 1µM en suspension dans une solution aqueuse de bicarbonate d'ammonium à 50 mM. Les billes en gouttes sont aussi suspendues à 10 mg/mL dans une solution de bicarbonate d'ammonium à 50 mM. Plusieurs trains de gouttes peuvent être générés à la suite et les gouttes sont séparées entre elles par 1,5 µL d'huile fluorée pour éviter qu'elles ne fusionnent lors de leur déplacement au sein du capillaire. Une fois les gouttes générées dans le capillaire, elles sont déplacées vers la pince magnétique qui permet de transférer les billes fonctionnalisées dans la goutte d'échantillon, puis les gouttes sont déplacées dans la partie du capillaire qui est sur la plaque chauffante. La température sur la plaque a été fixée à 50°C afin que la trypsine greffée sur les billes soit active et que la digestion puisse avoir lieu de manière efficace. Pendant le temps de la digestion, typiquement 30 minutes, les gouttes subissent un va-et-vient continu afin de générer des recirculations à l'intérieur de la goutte pour favoriser la digestion complète des protéines présentes dans la goutte. Après la digestion, les gouttes passent de nouveau par la pince magnétique grâce à laquelle les billes sont extraites de la goutte d'échantillon et relarguées dans la goutte initiale vide. Ensuite la goutte d'échantillon est déplacée proche du

bout libre du tubing et une goutte de matrice est aspirée de la même manière que les autres gouttes du train : en pipetant dans un puit contenant la solution de matrice puis dans un puit contenant l'huile fluorée. La goutte de matrice est composée d'un mélange 50/50 d'eau et acétonitrile avec 1% d'acide trichloro acétique (TCA) et 2mg/mL de l'acide α-Cyano-4-hydroxy-cinnamic HCCA. La goutte de matrice et la goutte d'échantillon, ainsi que l'huile qui les entoure, sont ensuite déposées sur une plaque MALDI (Figure 57). Quand elles entrent en contact sur la plaque, les gouttes coalescent spontanément. La goutte qui contient les billes magnétiques est éliminée et le processus de pipetage de la matrice et dépôt de la matrice et de l'échantillon peut être renouvelé pour les trains suivants.

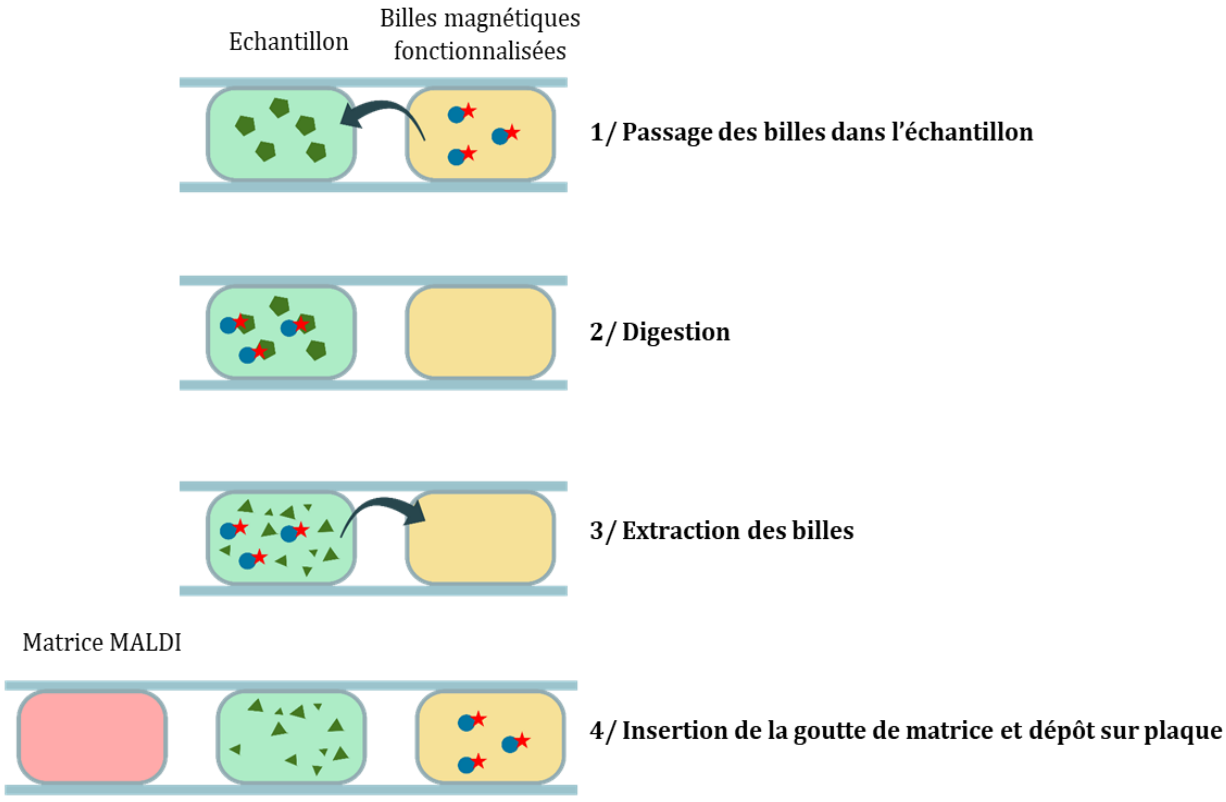


Figure 56 : Schéma du processus microfluidique.

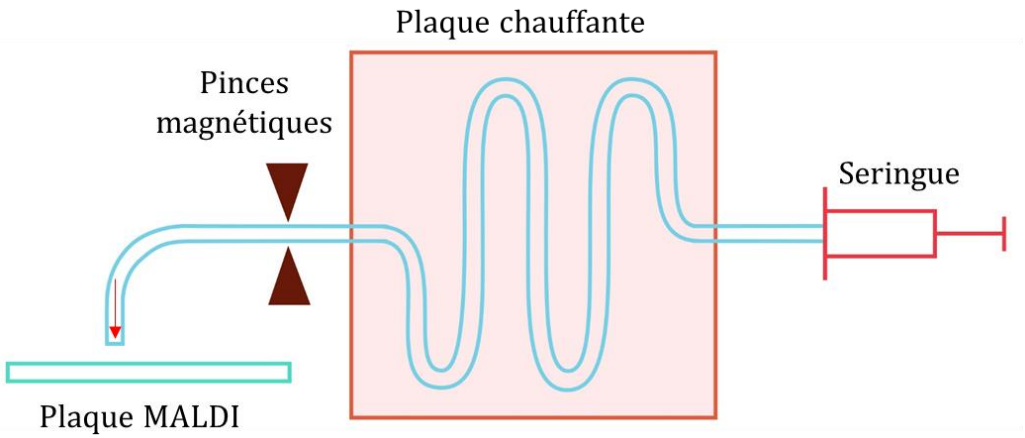


Figure 57 : Schéma de l'expérience lors du dépôt sur la plaque MALDI. La flèche rouge représente le sens du flux.

iii. Optimisation de l'insertion de la goutte de matrice dans le train de gouttes

Dans un premier temps, la goutte de matrice a été incluse dans le train de gouttes original pour limiter le nombre de manipulations microfluidiques. Cependant, des premières expériences ont montré que les peptides générés lors de la digestion du lysozyme n'étaient pas détectés avec le spectromètre de masse. Cela était dû à une mauvaise co-cristallisation de la matrice avec l'échantillon car un deuxième ajout manuel de matrice pour recristalliser l'échantillon a bien révélé la présence des peptides. Notre hypothèse a été que la composition de la matrice pouvait être modifiée lors de l'incubation de la goutte à 50°C pendant l'étape de digestion enzymatique. En effet, la matrice est composée d'eau et d'acétonitrile en proportion 1/1 avec 1% d'acide trichloro acétique (TCA, de Sigma) et 2mg/mL de l'acide α-Cyano-4-hydroxy-cinnamic HCCA (de Fluka). L'acide couramment utilisé pour ce type de matrice est l'acide trifluoro acétique (TFA, de Sigma Aldrich) mais il a été remplacé par le TCA pour les expériences en gouttes pour éviter que le TFA ne passe dans l'huile fluorée [13]. Le HCCA est la molécule qui compose la matrice et qui co-cristallise avec l'échantillon pour absorber l'énergie lors de la volatilisation de l'échantillon et l'acide agit comme source de proton pour l'ionisation. L'acétonitrile est nécessaire pour la solubilisation du HCCA qui n'est pas soluble dans l'eau. Cette composition a été optimisée par nos collaborateurs du CEA [13]. La matrice est ajoutée en proportion 1/1 à l'échantillon.

Pour valider l'hypothèse de variation de la composition de la goutte de matrice, nous avons commencé par vérifier le pH des gouttes de matrice après des durées variables passées à 50°C en les recueillant sur du papier pH. Nos résultats montrent que celui-ci reste constant (inférieur à 1)

ce qui signifie que la matrice reste suffisamment acide même après 2h à 50°C. Nous avons aussi mesuré la taille des gouttes avant et après le chauffage et nous avons montré que la longueur des gouttes diminue au cours du temps et qu'après 2h la goutte a perdu presque un tiers de sa longueur initiale (Figure 58).

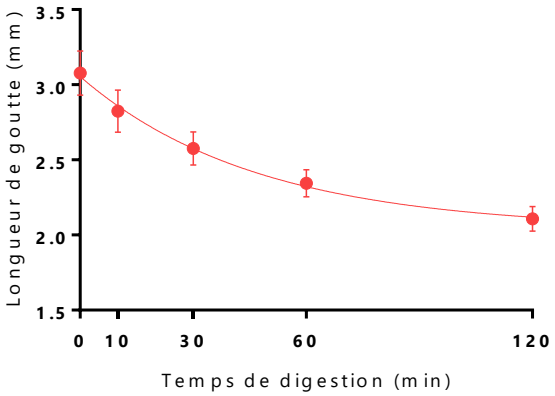


Figure 58 : évolution de la taille d'une goutte de 200nL de matrice après différents temps de chauffage à 50°C. Moyennes effectuées sur 20 gouttes, les barres d'erreur sont les écarts type. La courbe de tendance est une exponentielle.

La perte de volume d'une goutte de matrice pourrait s'expliquer par l'évaporation au sein du capillaire de l'acétonitrile présent dans la goutte. En effet, le contrôle avec une goutte d'eau pure montre que la goutte conserve son volume et qu'il n'y a pas de transfert dans l'huile. De plus, à partir de 30 min de chauffage, il est possible d'observer des cristaux qui se forment dans certaines gouttes de matrice, ce qui traduit bien une diminution du pourcentage d'acétonitrile présent dans la goutte. En effet, le HCCA présent dans la matrice n'est pas soluble dans l'eau et on fait l'hypothèse que les cristaux observés correspondent à la cristallisation du HCCA (Figure 59).

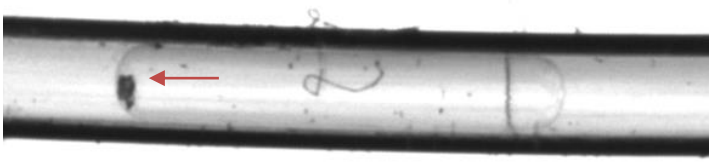


Figure 59 : Photo d'une goutte de matrice dans le capillaire après 2h à 50 °C. La flèche rouge indique les cristaux de HCCA qui se forment à cause d'une perte d'acétonitrile dans la goutte.

Cette variation de la concentration en acétonitrile au sein de la goutte de matrice explique pourquoi la co-cristallisation avec l'échantillon a été peu efficace lors de cette première série d'expériences et donc pourquoi les peptides ne sont pas détectés par cette méthode lors de la premières séries d'expériences. Afin d'améliorer l'approche, nous avons choisi d'insérer la goutte de matrice dans le train de goutte uniquement après l'étape de digestion, juste avant le dépôt sur la plaque MALDI afin d'éviter qu'elle subisse une incubation à 50 °C.

Lors de cette étude sur le positionnement de la goutte de matrice dans le processus, nous avons également étudié les différentes approches permettant de fusionner les gouttes de matrice et d'échantillon digéré, cette fusion pouvant avoir lieu soit au sein du capillaire soit directement sur la plaque MALDI, l'objectif étant d'obtenir les meilleures conditions de co-cristallisation. A ce stade, nous avons considéré que les flux de recirculation à l'intérieur des gouttes confinées pourraient augmenter le mélange entre l'échantillon et la matrice avant le dépôt et la cristallisation, nous avons donc dans un premier temps privilégié la fusion de ces deux gouttes au sein du capillaire. Cependant, les expériences effectuées avec fusion des deux gouttes dans le capillaire ou fusion sur la plaque ont montré que la fusion dans le capillaire ne permet pas d'augmenter le signal détecté par spectrométrie de masse (Figure 60). La goutte d'échantillon de 200 nL pour cette expérience était du lysozyme digéré par de la trypsine libre modifiée (porcine trypsin seq grade modified de Promega) pendant 30 min à 50°C. Nous en avons déduit que les recirculations créées par l'effet Marangoni à l'intérieur de la goutte déposée sur la plaque suffisent au mélange efficace de l'échantillon avec la matrice.

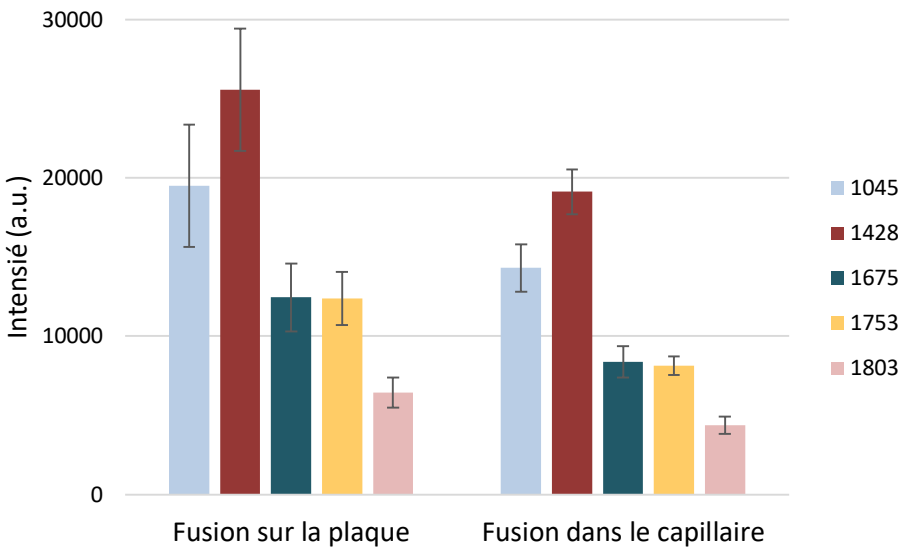


Figure 60 : Intensité de cinq pics du spectre de masse correspondants aux peptides générés par la digestion du lysozyme par la trypsine. A gauche, la goutte de matrice et la goutte d'échantillon ont fusionné sur la plaque. A droite, la goutte de matrice et la goutte d'échantillon ont fusionné dans le capillaire. Les barres d'erreur sont l'erreur type. Le nombre de gouttes déposées est de cinq pour chaque condition.

2. Dépôt des gouttes sur la plaque et effet de concentration

Pour conserver l'avantage de la concentration des cristaux due à l'effet Marangoni dans notre expérience, nous avons tout d'abord essayé d'adapter le protocole de nos collaborateurs du CEA [13] à notre processus en gardant la même huile et la même concentration en tensioactif. L'huile qu'ils utilisent est la FC-72 (perfluorohexane) combinée à une concentration de 2% en masse en 1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-decanol (PFD, de Fluorochem) permet d'obtenir l'effet Marangoni précédemment décrit. Leur système diffère de celui que nous avons implémenté pour la digestion en gouttes notamment dans la façon de générer les gouttes. En effet, ils génèrent à haut débit des gouttes de 4nL sur une puce microfluidique avec une jonction T, tandis que nous générons des gouttes de 200nL avec un robot de pipetage dans différents puits d'une plaque multi-puits pour avoir un train composé de gouttes de différentes compositions de manière simple et automatisée. Cependant, des premières expériences ont montré la difficulté de manipuler cette huile avec notre système. En effet, cette méthode de génération de gouttes expose à la création de bulles d'air lorsque l'huile est très volatile car elle est en contact direct avec l'air au bout du capillaire lors de la création du train de gouttes. Pour limiter ce phénomène ainsi que l'évaporation de la FC72 pendant le pipetage, nous avons placé au-dessus de la plaque multi-puits, selon le protocole de [14], un bain d'huile minérale, de densité plus faible que celles de l'eau et

l'huile fluorée. Malgré cette précaution, nous avons observé la création de microbulles d'air dans la capillaire, formées probablement sur le capillaire lorsqu'il entre dans le bain d'huile minérale non mouillante pour le capillaire en PTFE. Ces bulles d'air sont un vrai problème car leur volume augmente rapidement, d'autant plus lors de la digestion et du chauffage du capillaire à 50°C, et elles perturbent le train de gouttes. De plus, si l'huile s'évapore dans le capillaire, le dépôt sur la plaque ne sera plus de la composition voulue en huile et tensioactif et donc l'effet de concentration peut être modifié. Nous avons donc cherché à optimiser les conditions de génération de gouttes avec d'autres types d'huile, moins volatiles (Table 2) qui soient compatibles avec l'effet de concentration préalablement observé par nos collègues du CEA. Ces expériences de dépôts ont été réalisées par Florent Malloggi et Sarah Bregant avec des huiles fluorées que nous utilisons habituellement pour générer les gouttes par pipetage : la FC-40 et la HFE – Novec 7500 de 3M (Fluorinert), qui sont moins volatiles que la FC-72.

	Eau	FC-40	HFE – Novec 7500	FC-72
Pression de vapeur saturante (kPa)	2.8	0.29	4.1	31

Table 2 : Valeur des pressions saturantes pour l'eau et 3 types d'huiles fluorées. Plus la valeur est élevée, plus l'espèce est volatile. Source : fiches techniques de 3M.

En gardant une concentration en tensioactif perfluorodecanol (PFD) à 2%, aucun des dépôts avec ces deux huiles ne présentait la concentration due à l'effet Marangoni. En effet, comme expliqué dans la partie précédente, cet effet repose sur un phénomène dynamique lié à l'évaporation simultanée de l'huile contenant du tensioactif et du mélange eau/acétonitrile de la goutte. Il est donc attendu que la modification de la volatilité de l'huile, donc de sa vitesse d'évaporation, ait un impact important sur l'effet Marangoni et puisse même empêcher la bonne cristallisation de l'échantillon en ralentissant son séchage [15].

Nous avons néanmoins réussi à remettre en œuvre cet effet de concentration en modifiant un autre paramètre clé de l'effet Marangoni qui est la tension de surface de la goutte. En effet, en augmentant la concentration en tensioactif à 10% (w/w) dans l'huile HFE, la concentration des cristaux est de nouveau observée (Figure 61). Cette concentration de 10% est largement au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC) de ce tensioactif dans l'huile fluorée, qui est de l'ordre de 0.01% (w/w) [16], donc ne modifie pas la tension de surface lorsque le fluide est statique. Cependant des effets dynamiques peuvent avoir lieu, induisant des modifications locales de la tension de surface d'une goutte même si la concentration en tensioactif dans l'huile est supérieure à la CMC. Ces effets ont particulièrement été étudiés lors de la génération de gouttes

[17] [18] et, bien que les échelles de temps dans ces études soient beaucoup plus courtes (de l'ordre de la milliseconde) et donc que la comparaison avec notre système reste limitée, cela montre que des effets de modification de tension de surface dynamique peuvent avoir lieu bien au-dessus de la CMC. L'huile FC-40 en revanche n'a pas permis de retrouver l'effet de concentration, certainement à cause de sa volatilité encore plus faible que la HFE, et donc de son temps de séchage allongé.

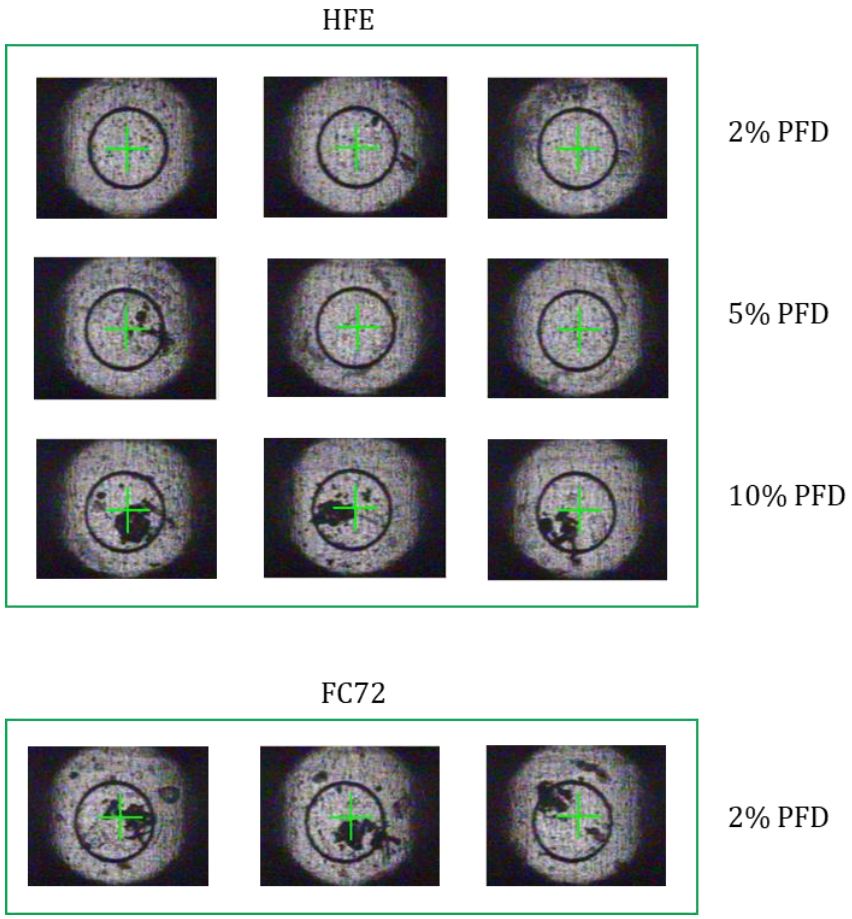


Figure 61 : Photographies de différents dépôt secs du mélange échantillon/matrice sur la plaque MALDI. La concentration est observée pour une concentration de 10% en perfluorodecanol (PFD) dans l'huile HFE et 2% en PFD dans l'huile FC-72.

Nous avons donc choisi de réaliser nos expériences avec l'huile fluorée HFE – Novec 7500, avec laquelle il est simple de pipeter des trains de gouttes sans générer de bulles d'air, avec une concentration de 10% en PFD permettant d'avoir l'effet Marangoni sur les échantillons déposés sur plaque MALDI. De plus le bain d'huile minérale au-dessus des puits n'est plus nécessaire car l'évaporation de l'huile HFE dans un puit est suffisamment lente par rapport au temps de pipetage des gouttes.

3. Fonctionnalisation des billes

i. Protocole de fonctionnalisation

L'étape de digestion sur billes en gouttes est l'étape critique de notre système, et ce qui fait sa valeur ajoutée par rapport à un simple dépôt en goutte. Pour la digestion, nous avons choisi d'utiliser la trypsine qui est une protéase couramment utilisée pour la digestion enzymatique. Le lysozyme (issu de blanc d'œuf de poule, de Sigma) a été pris comme protéine modèle car c'est une protéine qui est bien digérée par la trypsine. Nous avons commencé les expériences de digestion en utilisant des billes commerciales déjà fonctionnalisées avec de la trypsine (MagReSyn-trypsine de Resyn Biosciences, 5 à 10 µm de diamètre). Cependant, pour que la digestion avec ces billes soit efficace, il est nécessaire de dénaturer en amont les protéines avec de l'urée à haute concentration qui doit ensuite être éliminée de l'échantillon, ce qui ajouterait des étapes au protocole en goutte. De plus la taille importante de ces billes entraine une sédimentation rapide qui complique leur pipetage de manière reproductible en gouttes.

Pour simplifier le protocole de traitement des protéines et éviter l'étape de dénaturation, nous avons fonctionnalisé nous-mêmes des billes magnétiques avec de la trypsine. Nous avons comparé l'efficacité de digestion et les spectres de masse obtenus avec deux protocoles de fonctionnalisation basés sur le même principe. Il consiste à greffer de manière covalente la trypsine (trypsin from bovin pancreas, de Sigma) à la surface de billes fonctionnalisées par des groupements carboxyliques. Les groupements amines primaires, très abondants en général dans les protéines, réagissent avec les groupements carboxyliques des billes (Figure 62). Pour cela, nous utilisons deux activateurs : l'EDC (3-dimethyl amino propyl ethyl carbodiimide) et le S-NHS (n-Hydroxy sulfo succinimide). L'EDC est un carbodiimide qui forme un ester activé à partir des groupements carboxyliques présents à la surface des billes. En présence de protéines, cet ester peut former la liaison amide directement mais il est très facilement hydrolysable et reformera préférentiellement l'acide. Le S-NHS permet de stabiliser cet ester en le modifiant en un ester plus stable tout aussi actif qui peut former une liaison amide avec une protéine.

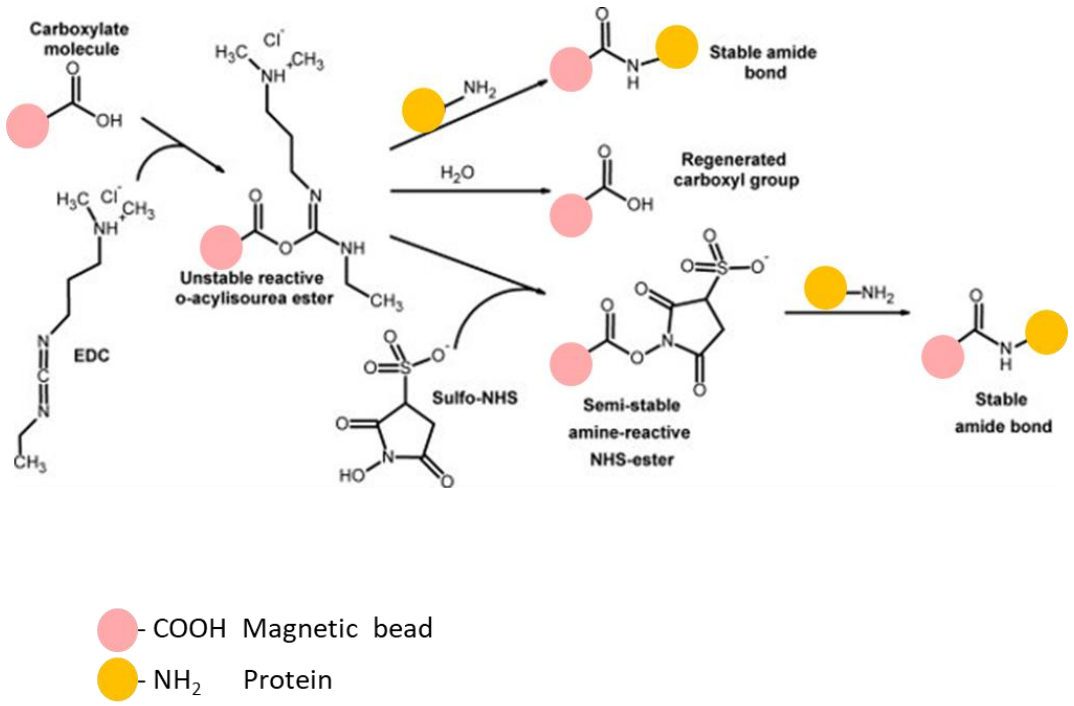


Figure 62 : Schéma des réactions chimiques de la formation de la liaison amide entre billes et protéine par l'activation au EDC et S-NHS.

Les protocoles qui ont été testés sont celui décrit dans la thèse de Nicolas Minc [19] (et publié dans [20]), qui utilise des billes carboxyliques de 600 nm vendues par Ademtech, et celui décrit dans [7] qui utilise les Dynabeads M270 de diamètre 2.8 µm vendues par Invitrogen. Les protocoles détaillés et le matériel utilisé sont rapportés en Annexe 3. Outre la différence de billes fonctionnalisées, ces deux protocoles utilisent des quantités et ratio différents de trypsine, EDC et S-NHS. Les billes fonctionnalisées obtenues par les deux protocoles ont été mises en tube en présence de lysozyme à 1µM en solution de 50µL de bicarbonate d'ammonium à 50 mM à 50°C pendant 2h sous agitation. Les spectres de masses obtenus après digestion présentent dans les deux cas les pics correspondant aux peptides attendus pour la digestion du lysozyme par la trypsine. Nous avons noté que les spectres obtenus avec les billes Ademtech sont généralement d'un peu moins bonne qualité (intensités des pics de peptides de lysozyme plus faible et spectres plus bruités avec une autolyse de la trypsine plus importante) que ceux obtenus avec les billes

M270 (Figure 63). Nous avons donc choisi d'utiliser ce dernier protocole pour la suite des expériences.

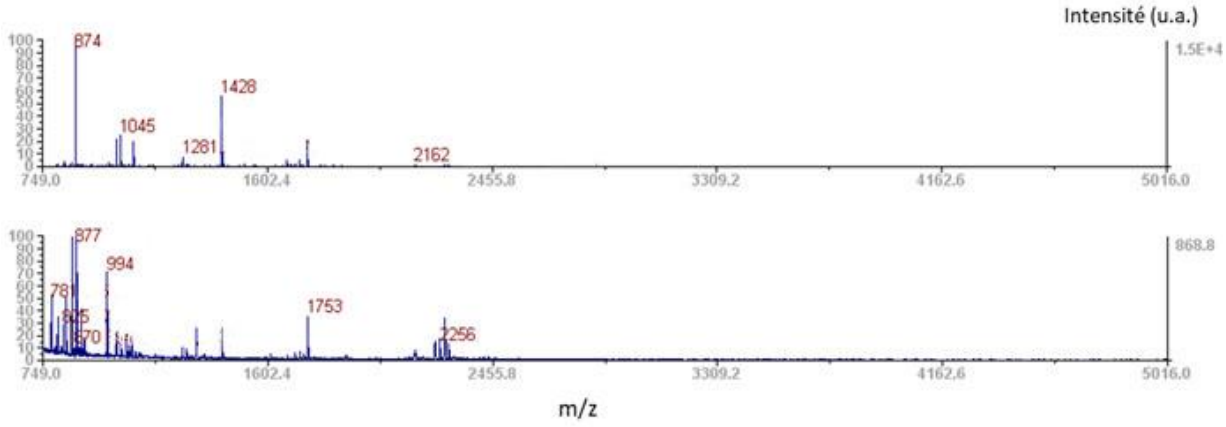


Figure 63 : En haut : spectre de masse obtenu avec la digestion par les billes M270 fonctionnalisées avec le protocole de [7], en bas : spectre de masse obtenu avec digestion par les billes Ademtech fonctionnalisées avec le protocole de [20]. Ce dernier apparait plus bruité avec des pics de plus faibles intensités (échelle à droite). Les pics correspondants à ceux attendus pour la digestion du lysozyme par la trypsine sont ceux à 874, 1045, 1428 et 1753.

ii. Quantification de la trypsine greffée

Afin de caractériser le système de digestion et de le comparer à des conditions standard, nous avons cherché à mesurer la quantité de trypsine présente en goutte pour la digestion sur billes, j'ai effectué un essai Bradford avec l'aide de John Manzi de la plateforme BMBC de l'UMR 168 à l'Institut Curie. Cette méthode, très courante pour la mesure de concentrations de protéines, est un dosage colorimétrique basé sur le changement d'absorbance du bleu de Coomassie après complexation avec des acides aminés. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, ce qui indique la concentration en protéine dans l'échantillon. Effectuer cet essai directement sur les billes fonctionnalisées donnerait un résultat faussé à cause de l'absorption des billes magnétiques et du fait que le changement d'absorbance du colorant serait localisé uniquement à la surface des billes. Nous avons donc réalisé une mesure indirecte en mesurant la concentration de trypsine restante dans le surnageant obtenu après la fonctionnalisation des billes, que nous avons soustrait à la quantité initiale présente. Cela nous a permis d'estimer que la quantité de trypsine greffée sur 0.3 mg de billes est de 90 µg ± 40 µg (moyenne sur 4 réactions de greffage ± écart type). Nous pouvons en déduire que la concentration de trypsine dans une goutte de 200 nL, qui contient 2 µg de billes, est en moyenne de 3 mg/mL, soit environ 100 µM. Cette valeur est assez élevée comparée à la concentration de protéine qu'on cherche à digérer, 1µM de

lysozyme, il est donc envisageable de diminuer la concentration de billes fonctionnalisées présentes en gouttes tout en gardant une digestion efficace. Pour comparer, pour une digestion classique en tube avec la trypsine de Promega non greffée, il est recommandé d'utiliser 20 ng/µL, soit moins de 1 µM pour digérer la même quantité de protéine.

III. Résultats et discussion

1. Optimisation du protocole de digestion enzymatique en gouttes

i. Acquisition des spectres de masse

Lors de l'acquisition des spectres par MALDI-TOF MS, il a été nécessaire de faire des choix qui peuvent influencer les résultats obtenus. Un premier point a été de fixer la puissance du faisceau laser (3500 u.a.) et de la garder constante pour tous les dépôts de la plaque pour pouvoir comparer les intensités des dépôts entre eux sur une même plaque. Cela nous a contraint à acquérir et analyser des spectres parfois sur ou sous-exposés au laser, donc pas forcément optimisés en terme de ratio signal/bruit. Pour l'étape d'interrogation et d'identification de protéine à partir de l'empreinte en masse des peptides, les spectres ont parfois été acquis une deuxième fois pour avoir un signal plus optimisé.

Un autre choix expérimental a été de ne pas passer la plaque en mode automatique mais de viser manuellement la région d'impact du laser pour chaque dépôt. En effet, malgré la présence de l'effet Marangoni, la concentration du dépôt est souvent excentrée et il faut s'assurer que le laser impacte la bonne région du dépôt (Figure 64). Cette contrainte présente pour l'instant une limitation de notre système.



Figure 64 : Exemple de cristallisation non centrée.

ii. Formation d'un agrégat de billes en gouttes

Après avoir vérifié l'efficacité de digestion avec les billes magnétiques fonctionnalisées en tubes, nous avons transposé l'expérience dans des gouttes de 200 nL. Ce volume de goutte permet d'avoir un dépôt de 400 nL sur la plaque après l'ajout de la goutte de matrice, ce qui fournit une bonne quantité de cristaux pour l'analyse dans le spectromètre de masse (le dépôt standard à la pipette est en général de 1µL). De plus, ce volume est proche de celui déposé en gouttes par nos collaborateurs (500 nL) qui ont observés l'effet de concentration. Grâce au protocole microfluidique décrit dans la partie I de ce chapitre, les pics de ratio masse/charge caractéristiques des peptides du lysozyme, initialement présent à 1µM dans une solution de bicarbonate d'ammonium à 50 mM, après une digestion par la trypsine ont pu être détectés par MALDI-TOF MS (Figure 65).

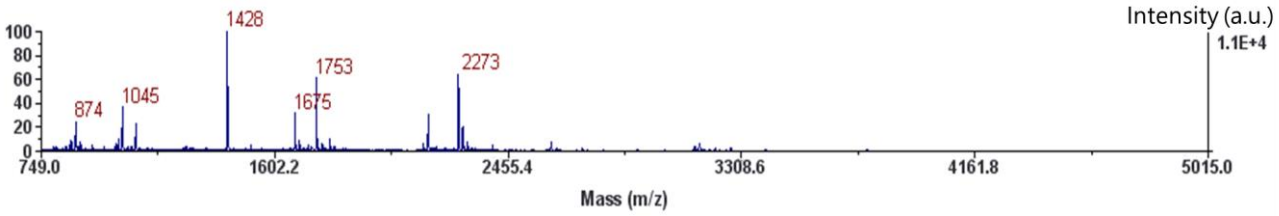


Figure 65 : Spectre typique obtenu après digestion sur billes en goutte. Les pics marqués correspondent aux peptides du lysozyme, le pic à 2273 est un pic d'autolyse de la trypsine.

Malgré ces résultats très encourageants, nous avons observé que les billes présentes au sein des gouttes forment spontanément un agrégat après avoir parcouru quelques centimètres dans le capillaire (Figure 66). Celui-ci apparait assez compact et difficile à disloquer. Nous expliquons l'accumulation des billes par les recirculations de fluide présentes dans la goutte en mouvement et par les interactions entre les billes dues au greffage de protéines puisque que cette agrégation est absente lorsque des billes non greffées sont utilisées. Ce type d'agrégation entre billes est aussi rapporté dans l'utilisation du lit fluidisé avec ces mêmes billes greffées avec de la trypsine [7].

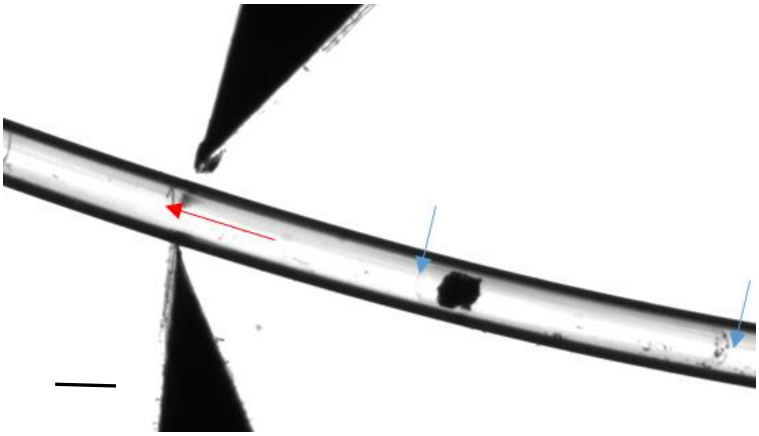


Figure 66 : Goutte à l'approche de la pince magnétique. Les flèches bleues sont des repères visuels pour le début et la fin de la goutte. La flèche rouge représente le sens du flux. Les billes magnétiques apparaissent agrégées entre elles avant même d'être soumises à la force magnétique. La position de cet agrégat dans la goutte dépend de la forme des recirculations fluidiques dans la goutte [21]. La barre d'échelle représente 600µm.

La formation de cet agrégat de billes pourrait s'avérer problématique s'il limite l'efficacité de la digestion enzymatique en rendant peu accessibles les billes, et donc la trypsine, qui se trouvent au centre de l'agrégat. Pour limiter ce possible effet, nous avons essayé de réduire les interactions entre billes en passivant les groupements carboxyliques activés mais non fonctionnalisés avec de l'éthanolamine à la fin de la réaction de greffage avec la trypsine, selon le protocole décrit dans [22]. Cependant, les billes s'agrègent autant avec l'ajout d'éthanolamine que sans et les résultats de digestion obtenus sont un peu moins bons pour les billes comportant de l'éthanolamine car les intensités des pics de peptides du lysozyme sur les spectres de masse obtenus sont un peu moins élevées (Figure 67). Cette méthode n'est pas intéressante en l'état donc nous avons investigué d'autres pistes pour trouver des conditions de digestion optimales. Une piste qui n'a pas été explorée pendant ma thèse, mais qui pourrait réduire les interactions entre billes par répulsion stérique, est de fonctionnaliser les billes magnétiques avec des polymères PEG-amine puis d'ajouter la trypsine par-dessus. Nous avons ici exploré d'autres pistes qui ne sont pas liées à la fonctionnalisation des billes magnétiques.

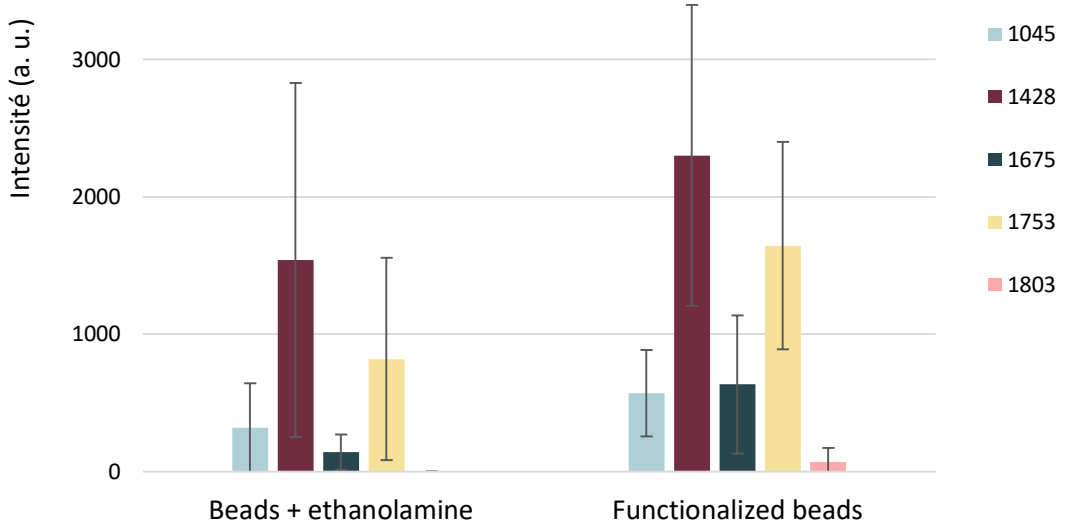


Figure 67 : Intensité de 5 pics de masse (légende à droite) correspondant à des peptides du lysozyme obtenus par MALDI-TOF MS. Les intensités obtenues avec digestion par des billes greffées complétées par l'éthanolamine sont un peu plus faible que celles obtenues sans éthanolamine. Les barres d'erreurs sont l'écart type. Pour chaque condition 4 gouttes ont été déposées sur la même plaque.

iii. Amélioration de la digestion par stimulations mécaniques ou ajout de tensioactifs

Afin d'augmenter l'efficacité de la digestion et donc l'intensité du signal mesuré au spectromètre de masse, nous avons effectué la digestion de 1µM de lysozyme en goutte en ajoutant une vibration pendant la digestion et/ou un détergent en solution. En effet, la stimulation mécanique de la vibration pourrait permettre de déstabiliser au moins partiellement l'agrégat de billes et donc d'augmenter le nombre de sites accessibles pour la digestion et l'ajout de détergent peut aussi empêcher les billes de s'agréger en limitant les interactions non spécifiques entre les billes. Ces expériences réalisées pour optimiser la digestion sur billes en gouttes sont effectuées comme précédemment avec une phase de digestion de 30 min à 50°C sur des gouttes de 200nL.

Le système de vibration utilisé est constitué d'un micro moteur vibrant (de type vibreur de téléphone) alimenté avec un courant de 0.04 A et une tension de 2.4 V. L'amplitude de vibration atteinte est autour de 11 g et la fréquence proche de 200 Hz. Ce vibreur est fixé sur la plaque en laiton dans laquelle le capillaire en PTFE est introduit afin que les vibrations soient transmises aux gouttes pendant la digestion sur la plaque chauffante. Si cette vibration avait permis de disloquer l'agrégat de billes, nous aurions attendu une augmentation de l'efficacité de digestion par l'augmentation du nombre de sites enzymatiques accessibles. Une observation visuelle ne permet cependant pas de conclure quant à un impact de la vibration sur la compacité de l'agrégat de billes qui reste intègre.

Lorsque des particules solides comme des billes magnétiques sont utilisées en microfluidique, il est courant d'utiliser une protéine comme la BSA ou un détergent comme le Tween-20 [23] [14] pour éviter que les billes ne s'agrègent et réduire l'adsorption non spécifique sur les billes. Toutefois, il est inutile d'utiliser une protéine comme la BSA dans notre système car celle-ci serait digérée par la trypsine et il est aussi déconseillé d'utiliser un détergent comme le Tween-20 car il interfère avec la détection de peptides et l'identification de protéines au MALDI-TOF MS [24]. Nous avons donc utilisé le détergent non ionique octyl β-glucopyranoside (ou n-octylglucoside, de Sigma) qui n'influence pas le spectre de masse MALDI et peut être utilisé pour améliorer la qualité de la digestion par la trypsine et pour obtenir une cristallisation de matrice homogène [24]. Ce dernier point aurait pu être gênant pour l'obtention de l'effet Marangoni voulu dans nos dépôts, d'autant plus que ce détergent peut avoir un effet sur la tension de surface qui est la cause directe des recirculations dans la goutte déposée. Néanmoins, nos résultats expérimentaux montrent que la concentration locale des cristaux est conservée avec des échantillons déposés contenant ce détergent. Comme dans le cas de la vibration, l'ajout de ce détergent n'a pas d'effet visible sur l'agrégation des billes fonctionnalisées. La concentration utilisée est de 0.1% (m/m).

Au-delà de l'observation de l'agrégat de billes magnétiques, des expériences de digestion effectuées sur le lysozyme en présence de vibration et de détergent ont été réalisées. La Figure 68 montre une légère mais significative augmentation de l'intensité du signal détecté au spectre de masse lorsque la digestion se déroule en présence de détergent et de vibration. Bien que cette augmentation relative soit faible comparée aux barres d'erreurs qui représentent la dispersion importante obtenue, l'amélioration du signal avec détergent et vibration est confirmée par les résultats de l'identification du lysozyme lors de l'analyse. En effet, lors de la phase d'interrogation pour identifier les protéines présentes grâce aux empreintes en masse des peptides obtenus sur le spectre, la condition de digestion combinant le détergent et la vibration donne des meilleurs résultats (Table 3) avec une identification plus fiable du lysozyme comme première protéine présente dans l'échantillon, dont plusieurs au-dessus du seuil de validité. Sur la base de ces deux critères (intensité du signal et identification de protéine par empreinte de masse), nous avons choisi d'effectuer les expériences de digestion qui suivent en ajoutant 0.1% d'octyl β-glucopyranoside à l'échantillon et une vibration pendant la phase à 50°C pour obtenir un signal optimal.

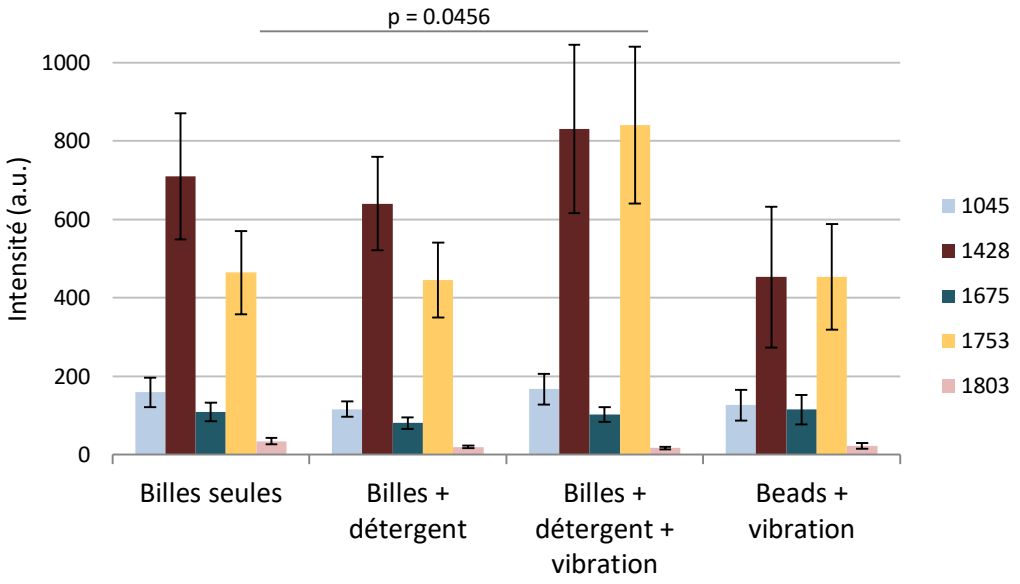


Figure 68 : Intensité de cinq pics de peptides du lysozyme digéré par la trypsine en fonction des différentes conditions de digestion en gouttes. Les barres d'erreur sont l'erreur type. Pour chaque condition, le nombre de gouttes déposées est de 15. La valeur p est calculée avec un test de Student.

Conditions de digestion	Dépôts où le lysozyme est la première protéine identifiée sur 15 dépôts	Dépôts où le lysozyme est la première protéine identifiée au-dessus du seuil de validation sur 15 dépôts
Billes seules	7	0
Billes + détergent	3	1
Billes + vibration	6	1
Billes + détergent +vibration	11	6

Table 3 : Résultats de l'interrogation des spectres de masses obtenus sur 15 dépôts pour chaque condition de digestion. Le seuil de validation est un score de protéine de 62 qui correspond à une erreur inférieure à 5%.

Ayant choisi ces paramètres, nous avons voulu discriminer les différentes contributions sur l'amélioration observée, en effet celle-ci peut être liée soit à l'amélioration de l'efficacité de la digestion et/ou de la qualité de la cristallisation du dépôt. En effet, ces deux paramètres (la vibration et l'ajout de détergent) ne permettent pas d'observer un changement clair sur la formation de l'agrégat de billes, qui aurait pu nous permettre de conclure à l'amélioration de la digestion par l'augmentation de sites enzymatiques accessibles. De plus, l'article [24] sur lequel nous avons basé notre utilisation du détergent montre une influence de celui-ci sur la cristallisation, et, comme expliqué précédemment, il ne serait pas surprenant que ce détergent influence la tension de surface [25] et donc l'effet de concentration dans la goutte ainsi que la cristallisation. Afin de discriminer ces effets de digestion ou de dépôt, nous avons ajouté un

peptide « spike in » au sein de la matrice. Le peptide injecté est la substance P – tyrosine 8 qui produit un pic sur le spectre de masse à 1363.72 u.a.. La concentration choisie est de 10nM afin que l'intensité du pic soit dans la même gamme que celles des peptides fournis par le lysozyme. Ce peptide est ajouté avec la matrice, après la digestion, afin que la quantité déposée sur la plaque ne dépende pas de la digestion.

Dans le cas où les différents paramètres de digestion testés (avec/sans vibration/détergent) n'influenceraient pas la digestion mais seulement la qualité de la cristallisation, une meilleure qualité de cristallisation se traduirait par l'augmentation simultanée de l'intensité des pics des peptides de lysozyme et du spike-in. Dans ce cas, le rapport de l'intensité d'un peptide du lysozyme (ici la masse 1428 a été choisie pour son intensité assez élevée) avec l'intensité correspondant au spike-in devrait rester constant quels que soient les paramètres. Par contre, si ces paramètres influencent plutôt l'efficacité de la digestion, la quantité de peptides du lysozyme déposés, donc le signal détecté, devrait augmenter lorsque la digestion est plus efficace, mais pas l'intensité du spike-in. En effet, comme la quantité de spike-in déposée reste constante, l'intensité de son signal devrait rester constante ou diminuer à cause des effets de compétition lors de l'ionisation et de l'augmentation de la quantité de peptides dans l'échantillon [26]. Dans ce cas, le rapport entre l'intensité d'un peptide du lysozyme et l'intensité du spike-in devrait augmenter lorsque la digestion est plus efficace. Comme le montre la Figure 69, c'est ce dernier cas que nous avons observé sur une moyenne de 10 dépôts pour chacune des quatre conditions. Nous pouvons donc en conclure que, bien qu'ils ne semblent pas avoir d'effet sur l'agrégation visible des billes fonctionnalisées, la vibration et l'ajout de détergent rendent la digestion plus efficace. L'effet de compétition ne permet néanmoins pas de conclure quant à l'absence totale d'un effet sur la cristallisation, qui s'il est présent semble mineur par rapport à l'effet sur la digestion.

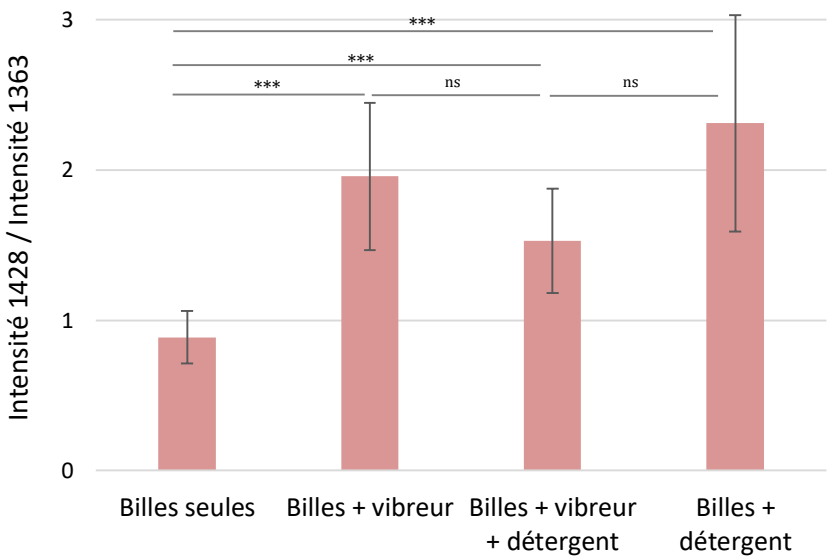


Figure 69 : Rapport de l'intensité du peptide de masse 1428 sur l'intensité du peptide spike-in en fonction des conditions de digestion. Ce ratio apparait plus élevé en présence de vibreur et/ou détergent, traduisant une meilleure efficacité de la digestion dans ces cas. Les barres d'erreurs sont l'écart-type. La moyenne est effectuée sur environ 10 dépôts pour chaque condition. Les trois astérisques correspondent à une valeur $p<0.001$, calculée avec un test de Student.

En conclusion, nous avons démontré ici la possibilité de réaliser une digestion enzymatique en gouttes combiné à une analyse par MALDI-TOF MS en tirant partie d'un effet de concentration au sein des gouttes. Les paramètres expérimentaux optimisés permettent d'avoir une bonne digestion de la protéine modèle et des spectres de masses sur lesquels le lysozyme est identifiable grâce à l'empreinte en masse des peptides et ce pour une concentration en lysozyme de l'ordre de 1µM ce qui correspond à 200 fmol de protéines par goutte. Nous avons ensuite caractérisé plus avant le potentiel de notre approche notamment en analysant des échantillons peu concentrés et en réduisant le temps de digestion.

2. Digestion et détection d'échantillons peu concentrés

i. Effet de la concentration en protéines

Comme mentionné précédemment, nous avons tout d'abord évalué les performances de notre système sur de faibles quantités d'échantillon. Une concentration de 1µM de lysozyme dans une goutte de 200nL correspond à une quantité de protéines de 200 fmol. Pour déterminer la sensibilité de notre méthode couplant digestion et spectrométrie de masse, cette concentration

de travail a été diluée par 10 et par 100. Les spectres de masses obtenus montrent, comme attendu, une diminution de l'intensité du signal (non linéaire) pour l'ensemble des peptides du lysozyme (Figure 70). Pour une concentration en lysozyme de 10 nM, le signal est trop faible pour que le lysozyme soit identifié (

Table 4). Pour une concentration de 100 nM, on observe les pices du lysozyme sur le spectre de masse mais il n'est identifié que dans 4 dépôts sur 10 et n'est jamais identifié comme la première protéine présente ni au-dessus du seuil de validation. Pour une concentration de 1 µM en revanche, le lysozyme est toujours identifié et passe le seuil de validation dans 6 dépôts sur 10. Pour le lysozyme, la limite de détection et d'identification avec notre système semble se trouver entre 1 µM et 100 nM. Cependant cette limite peut varier d'une protéine à l'autre, selon la taille et le nombre de peptides produits par la digestion. Par exemple, le peptide « spike-in » utilisé dans l'expérience précédente produit un très bon signal même à 10 nM c'est-à-dire pour 2 fmol de peptides.

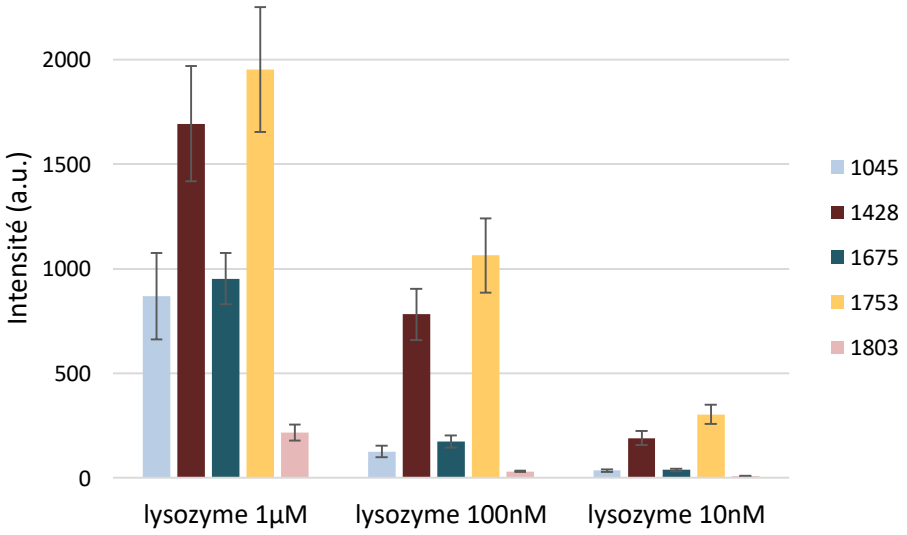


Figure 70 : Intensité moyenne sur 10 dépôts par condition de cinq peptides du lysozyme digéré en gouttes sur billes fonctionnalisées. Les barres d'erreur sont l'erreur type.

Concentration	Dépôts où le lysozyme est identifié sur 10 dépôts	Dépôts où le lysozyme est la première protéine identifiée au-dessus du seuil de validation sur 10 dépôts	Nombre moyen de peptides attribués
1 µM 200 fmol/goutte	10	6	13.4
100 nM 20 fmol/goutte	4	0	11.25
10 nM 2 fmol/goutte	0	0	/

Table 4 : Résultats de l'interrogation des spectres de masses obtenus sur 10 dépôts pour chaque concentration. Le seuil de validation est un score de protéine de 62 qui correspond à une erreur inférieure à 5%.

ii. Dépôt sur une plaque rayée

Pour améliorer la sensibilité de détection des faibles quantités de protéine, il a été suggéré par nos collaboratrices de l'ESPCI, Emmanuelle Demey et Joëlle Vinh, de déposer les échantillons sur une plaque MALDI rayée. Les rayures, plus en moins fines, permettent parfois une meilleure co-cristallisation de la matrice avec l'échantillon sur la plaque. Des dépôts ont été effectués sur les deux types de rayures avec des concentrations initiales en lysozyme de 1 µM et 10 nM (Figure 71 et Figure 72). Sur ces deux expériences, la présence de rayures sur la plaque ne produit pas une augmentation significative de l'intensité détectée. Dans le cas de concentration de 10 nM, la présence de rayures fines sur la plaque a même plutôt tendance à réduire l'intensité du signal. Cette technique n'a donc pas été retenue pour la suite.

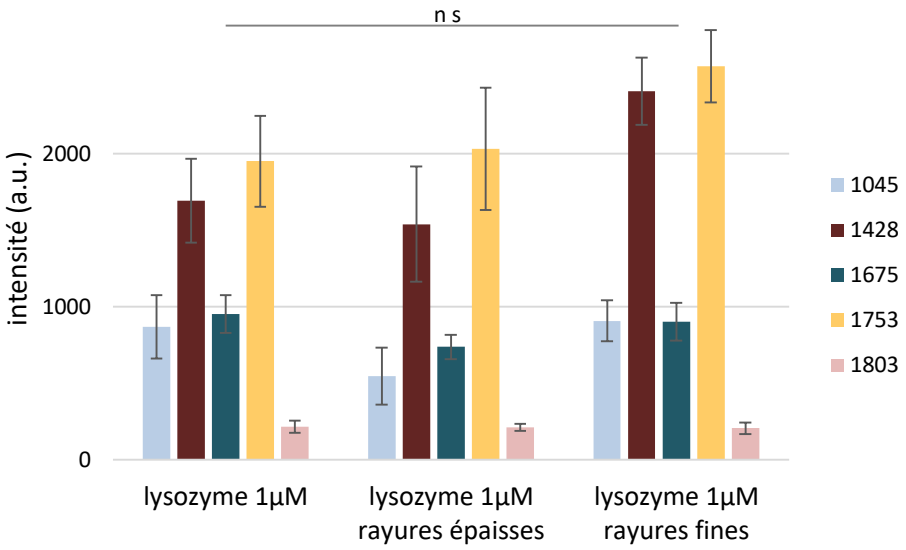


Figure 71 : Intensité de cinq pics du lysozyme à 1 µM obtenus après digestion dans la mêmes conditions en gouttes sur billes mais avec des dépôts sur des plaques de différentes rugosités. Le nombre de dépôts est de 10 sur la plaque lisse et 5 sur chaque plaque rayée.

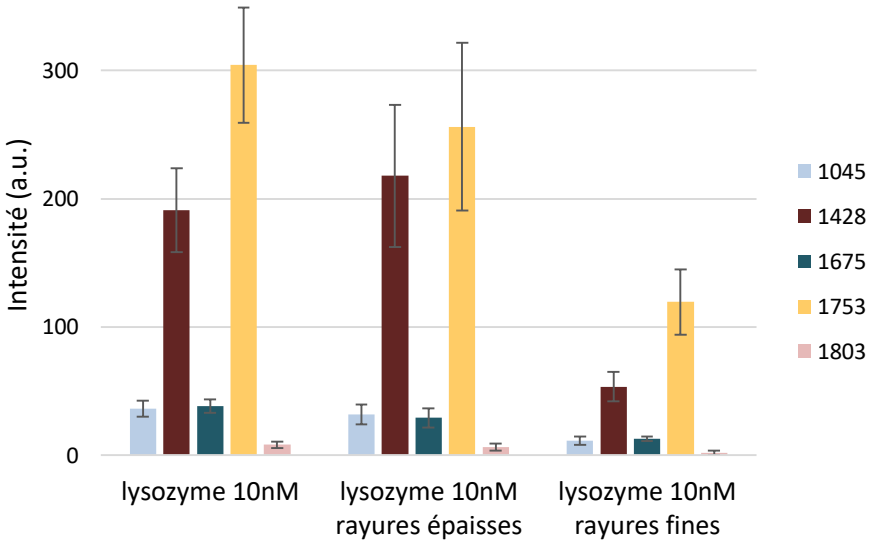


Figure 72 : Intensité de cinq pics du lysozyme à 10 nM obtenus après digestion dans la mêmes conditions en gouttes sur billes mais avec des dépôts sur des plaques de différentes rugosités. Le nombre de dépôts est de 10 sur la plaque lisse et 5 sur chaque plaque rayée.

Conditions de dépôt	Dépôts où le lysozyme est la première protéine identifiée sur 5 dépôts	Dépôts où le lysozyme est la première protéine identifiée au-dessus du seuil de validation sur 5 dépôts
1 µM sur rayures épaisses	5	5
1 µM sur rayures fines	5	5
10 nM sur rayures épaisses	0	0
10 nM sur rayures fines	0	0

Table 5 : Résultats de l'interrogation des spectres de masses obtenus sur 5 dépôts pour chaque condition. Le seuil de validation est un score de protéine de 62 qui correspond à une erreur inférieure à 5%.

3. Digestion et détection avec un temps de digestion réduit

Pour réduire le temps de préparation de l'échantillon, nous avons cherché à diminuer le temps de digestion enzymatique de 30 à 10 min. Les résultats obtenus sont montrés sur la Figure 73 et la Table 6. L'intensité des pics des peptides du lysozyme après 10 min de digestion est réduite par rapport à celle obtenue après 30 min de digestion, mais reste suffisante pour que le lysozyme soit la première protéine identifiée dans 8 dépôts sur 10, comme avec 30 min de digestion. Cependant, dans ces identifications, aucune ne dépasse le seuil de validité de 5% d'erreur avec une digestion de 10 min seulement alors que 6 sont au-dessus pour une digestion de 30 min. Cela s'explique par un nombre de peptides attribués plus faible (la moyenne est de 13.4 pour 30 min de digestion et 12.3 pour 10 min), ce qui rend l'identification moins robuste.

Ces résultats montrent qu'il y a un réel intérêt à faire une digestion de 30 min pour l'identification protéique mais qu'on peut obtenir des résultats qui peuvent être satisfaisants avec uniquement 10 min de digestion.

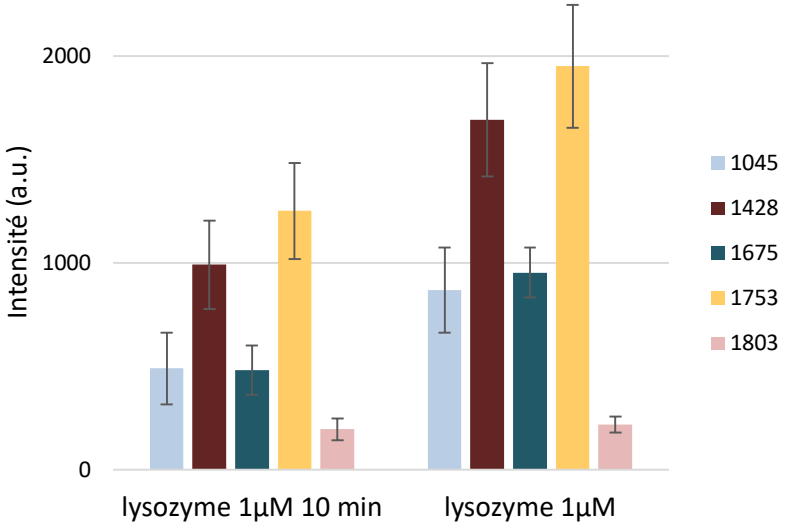


Figure 73 : Intensité moyenne sur 10 dépôts par condition de cinq peptides du lysozyme digéré en gouttes sur billes fonctionnalisées pendant 10 min (à gauche) et 30 min (à droite). Les barres d'erreur sont l'erreur type.

Temps de digestion	Dépôts où le lysozyme est la première protéine identifiée sur 10 dépôts	Dépôts où le lysozyme est la première protéine identifiée au-dessus du seuil de validation sur 10 dépôts	Nombre moyen de peptides attribués
10 min	8	0	12.3
30 min	8	6	13.4

Table 6 : Résultats de l'interrogation des spectres de masses obtenus sur 10 dépôts pour des temps de digestion de 10 min et 30 min. Le seuil de validation est un score de protéine de 62 qui correspond à une erreur inférieure à 5%.

IV. Conclusion et perspectives

Nous avons mis en place un système microfluidique automatisable qui permet de coupler la microfluidique de gouttes à la spectrométrie de masse MALDI-TOF : de la digestion enzymatique supportée en goutte au dépôt sur plaque avec pré-concentration de l'échantillon cristallisé. Une première preuve de concept a été réalisée avec le lysozyme comme protéine modèle et notre protocole permet d'identifier la protéine par empreinte de masses peptidiques à partir de 200 fmol de protéine avec une bonne fiabilité. Cependant, ces résultats sont marqués par une certaine dispersion et une reproductibilité parfois assez faible avec environ un tiers des dépôts effectués qui ne sont pas exploitables directement. Les causes possibles sont discutées dans cette partie, ainsi que les perspectives pour améliorer les résultats.

1. La digestion

Pour les dépôts qui ne donnent pas un signal exploitable, il est possible de redéposer manuellement, sans huile et donc sans l'effet de concentration, la solution de matrice sur le dépôt pour diluer puis recristalliser l'échantillon. Nous avons ainsi pu vérifier que la digestion supportée en goutte est toujours efficace, car les pics des peptides apparaissent lors de la deuxième cristallisation, mais qu'un problème de cristallisation peut survenir lors du dépôt en gouttes.

En outre, nous avons constaté de nouveau l'intérêt du dépôt en gouttes et de la concentration pour les échantillons qui donnent un bon signal dès la première cristallisation suite au dépôt en gouttes. En effet, lorsque la solution de matrice est redéposée manuellement sur de tels dépôts, le nombre de peptides identifiés diminue en moyenne de moitié par rapport au premier dépôt : il passe d'une dizaine en moyenne lors du premier dépôt en goutte à cinq lors du dépôt manuel. Notre hypothèse est que cette différence est due à la dilution et à la perte de l'effet concentrateur lors du dépôt manuel de matrice.

2. La cristallisation

Afin de mieux contrôler la cristallisation et l'effet de concentration il pourrait être nécessaire de contrôler l'environnement des dépôts. En effet, nous avons vu dans la première partie que l'effet Marangoni et la cristallisation sont fortement liés à la cinétique de l'évaporation de l'huile et de l'eau et l'acétonitrile composant la solution de matrice, et donc il apparait vraisemblable qu'une modification de l'environnement (température et humidité notamment) ait un impact sur la cristallisation et l'effet de concentration.

Enfin, même lorsque l'effet de concentration est bien présent sur le dépôt, il y aurait un réel intérêt à contrôler le positionnement de l'agrégat, qui est souvent excentré dans l'état actuel du système (voir Figure 64). En effet, à cause du positionnement aléatoire de la concentration, la zone d'impact du laser doit être choisie manuellement pour chaque dépôt et la plaque MALDI ne peut pas être passé en mode automatique car le laser risque de viser une zone dépourvue d'échantillon. Or, le passage en mode automatique est nécessaire non seulement pour réduire le temps d'analyse mais aussi pour réaliser des analyses couplées de type MS/MS avec fragmentation. En effet, la fragmentation de peptides permet de multiplier les informations obtenues lors de l'acquisition des spectres et d'obtenir des scores de confiance beaucoup plus élevés lors de l'identification. Par exemple, lors de l'ajout manuel de solution de matrice, une acquisition de 5 peptides avec 2 fragmentations a donné un score d'identification protéique bien plus élevé qu'une détection de 15 peptides sans aucune fragmentation. Cette méthode a notamment permis l'identification de deux protéines digérées en goutte dans le même échantillon, le lysozyme et l'albumine de sérum bovin (BSA), respectivement à 1µM et 0.3µM, alors que le dépôt en goutte avec une simple identification par empreinte de masses peptidiques ne permet d'identifier que le lysozyme. En pratique, l'identification sur la base d'une liste de masses de peptides seule ne se fait presque plus, la fragmentation est très souvent ajoutée. Ainsi, le centrage de la concentration du dépôt serait une vraie avancée puisqu'il permettrait l'automatisation de l'acquisition de spectres et la fragmentation de peptides.

Pour contrôler la position de la concentration, une idée est d'usiner la plaque MALDI au centre des emplacements de dépôts pour créer une sorte d'ancrage où les cristaux viendraient se déposer, dans un processus similaire à de la nucléation. Une deuxième piste de réflexion est de s'inspirer de la technologie « AnchorChip » de Bruker. Les plaques AnchorChip présentent des emplacements hydrophiles pour les échantillons entourés par une couronne hydrophobe afin d'éviter que l'échantillon ne s'étale. Dans notre cas, cela pourrait permettre de bien positionner la goutte d'échantillon de manière à avoir la concentration la plus centrée possible.

Bibliographie

[1] W.-w. Liu et Y. Zhu, «"Development and application of analytical detection techniques for droplet-based microfluidics"-A review,» *Analytica Chimica Acta,* vol. 1113, pp. 66-64, 2020.

[2] D. L. DeVoe et C. S. Lee, «Microfluidic technologies for MALDI-MS in proteomics,» *Electrophoresis,* vol. 27, pp. 3559-3568, 2006.

[3] P. Giansanti, L. Tsiatsiani, T. Yew Low et A. J. R. Heck, «Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin,» *Nature Protocols,* vol. 11, pp. 993-1006, 2016.

[4] K. Meller, M. Szumski et B. Buszewski, «Microfluidic reactors with immobilized enzymes – characterization, dividing, perspectives,» *Sensors and Actuators B,* vol. 244, pp. 84-106, 2016.

[5] Z.-H. Wei, X. Zhang, X. Zhao, Y.-L. Jiao, Y.-P. Huang et Z.-S. Liu, «Construction of a microfluidic platform integrating online protein fractionation, denaturation, digestion, and peptide enrichment,» *Talanta,* vol. 224, 2021.

[6] A. Kecskemeti et A. Gaspar, «Preparation and characterization of a packed bead immobilized trypsin reactor integrated into a PDMS microfluidic chip for rapid protein digestion,» *Talanta,* vol. 166, pp. 275-283, 2017.

[7] J. Bataille, A. Viodé, I. Pereiro, J. P. Lafleur, F. Varenne, S. Descroix, F. Becher, J. P. Kutter, C. Roesch, C. Poüs, M. Taverna, A. Pallandre, C. Smadja et I. Le Potier, «On-a-chip tryptic digestion of transthyretin: a step toward an integrated microfluidic system for the follow-up of familial transthyretin amyloidosis,» *Analyst,* vol. 143, pp. 1077-1086, 2018.

[8] S. Sun et R. T. Kennedy, «Droplet electrospray ionization mass spectrometry for high throughput screening for enzyme inhibitors,» *Analytical Chemistry,* vol. 86, pp. 9309-9314, 2014.

[9] W. Liu et Y. Zhu, «"Development and application of analytical detection techniques for droplet-based microfluidics"- A Review,» *Analytica Chimica Acta,* 2020.

[10] T. Hatakeyama, D. L. Chen et R. F. Ismagilov, «Microgram-scale testing of reaction conditions in solution using nanoliter plugs in microfluidics with detection by MALDI- MS,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 128, pp. 2518-2519, 2006.

[11] S. K. Küster, S. R. Fagerer, P. E. Verboket, K. Eyer, K. Jefimovs, R. Zenobi et P. S. Dittrich, «Interfacing droplet microfluidics with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Label-free content analysis of single droplets,» *Analytical Chemistry,* vol. 85, pp. 1285-1289, 2013.

[12] F. Pereira, X. Niu et A. J. deMello, «A nano LC-MALDI mass spectrometry droplet interface for the analysis of complex protein samples,» *PLoS ONE,* vol. 8, 2013.

[13] K. Mesbah, R. Thai, S. Bregant et F. Malloggi, «DMF-MALDI: droplet based microfluidic combined to MALDI- TOF for focused peptide detection,» *Scientific Reports,* vol. 7, 2017.

[14] D. Ferraro, J. Champ, B. Teste, M. Serra, L. Malaquin, J.-L. Viovy, P. de Cremoux et S. Descroix, «Microfluidic platform combining droplets and magnetic tweezers: Application to HER2 expression in cancer diagnosis,» *Scientific Reports,* vol. 6, 2016.

[15] F. Pereira, X. Niu et A. J. deMello, «A Nano LC-MALDI Mass Spectrometry Droplet Interface for the Analysis of Complex Protein Samples,» *PLOS ONE,* vol. 8, 2013.

[16] I. Hajji, Exploring the dynamics of cancer cell subpopulations and metastatic invasion using high throughput microfluidic sorting and typing, 2019.

[17] S. L. Anna et H. C. Mayer, «Microscale tipstreaming in a microfluidic flow focusing device,» *Physics of Fluids,* vol. 18, 2006.

[18] K. Wang, Y. C. Lu, J. H. Xu et G. S. Luo, «Determination of dynamic interfacial tension and its effect on droplet formation in the T-shaped microdispersion process,» *Langmuir,* vol. 25, pp. 2153-2158, 2009.

[19] N. Minc, Microfluidique et billes magnétiques auto-organisées pour les analyses biologiques, 2005.

[20] A. Le Nel, N. Minc, C. Smadja, M. Slovakova, Z. Bilkova, J.-M. Peyrin, J.-L. Viovy et M. Taverna, «Controlled proteolysis of normal and pathological prion protein in a microfluidic chip,» *Lab on a Chip,* vol. 8, pp. 294-301, 2008.

[21] C. N. Baroud, F. Gallaire et R. Dangla, «Dynamics of microfluidic droplets Charles,» *Lab on a Chip,* vol. 10, pp. 2032-2045, 2010.

[22] L. Sun, Y. Li, P. Yang, G. Zhu et N. J. Dovichi, «High efficiency and quantitatively reproducible protein digestion by trypsin-immobilized magnetic microspheres,» *Journal of Chromatography A,* vol. 1220, pp. 68-74, 2012.

[23] T. D. Mai, D. Ferraro, N. Aboud, R. Renault, M. Serra, N. T. Tran, J.-L. Viovy, C. Smadja, S. Descroix et M. Taverna, «Single-step immunoassays and microfluidic droplet operation: towards a versatile approach for detection of amyloid-β peptide-based biomarkers of Alzheimer's disease,» *Sensors and Actuators,* vol. 255, pp. 2126-2135, 2018.

[24] M. Rühl, S. Schönborn et M. Karas, «Detergent-assisted sample preparation for MALDI-MS: Investigation of octylglucoside and docecylmaltoside for matrix crystallization, on-plate digestion, and trypsin activity,» *Journal of Mass Spectrometry,* vol. 53, pp. 675-679, 2018.

[25] K. Shinoda, T. Yamaguchi et R. Hori, «The surface tension and the critical micelle concentration in aqueous solution of β-D-Alkyl glucosides and their mixtures,» *Bulletin of the Chemical Society of Japan,* vol. 34, pp. 237-241, 1961.

[26] R. Knochenmuss et R. Zenobi, «MALDI ionization: The role of in-plume processes,» *Chemical Reviews,* vol. 103, pp. 441-452, 2003.

Conclusion et perspectives

Durant cette thèse, j'ai travaillé sur le développement d'un système basé sur la microfluidique de gouttes et l'extraction de particules magnétiques pour l'analyse multi-omique d'un faible nombre de cellules dans un premier projet, et sur la préparation d'échantillon et plus particulièrement la digestion enzymatique sur phase solide pour l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF dans un second projet.

Dans un premier chapitre, les enjeux du développement des nouvelles méthodes miniaturisées pour l'analyse multi-omique de cellules uniques sont présentés, et mettent en valeur le potentiel de la microfluidique de gouttes comme technologie clé pour le développement de telles approches. Il existe actuellement plusieurs techniques, dont certaines sont commercialisées, pour analyser indépendamment le transcriptome ou le génome de cellules uniques en microfluidique de gouttes mais très peu de plateformes intégrées pour l'analyse multi-omique de cellules uniques. Au-delà de ces analyses d'acides nucléiques, ce premier chapitre décrit également l'intérêt de la microfluidique de gouttes pour l'analyse protéique. En effet, de nombreuses méthodes pour l'analyse protéique sont aussi miniaturisées en microfluidique de gouttes, en particulier le couplage de la préparation d'échantillon en gouttes pour l'analyse par spectrométrie de masse. En effet, la spectrométrie de masse est considérée comme une des techniques analytiques les plus puissantes à disposition des chercheurs et est largement adoptée dans différents domaines car elle permet à la fois la détection mais aussi d'obtenir des informations structurales sur les espèces à analyser. L'ionisation par électrospray (ESI) est la technique d'ionisation pour la spectrométrie de masse la plus populaire pour le couplage avec la microfluidique de gouttes mais, comme discuté dans le manuscrit, l'ionisation par désorption laser assistée par une matrice (MALDI) possède des avantages qui rendent aussi très intéressant son couplage à la microfluidique de gouttes.

Dans le chapitre 2, j'ai présenté le développement d'un système de microfluidique de gouttes permettant l'extraction et la séparation de l'ADN et l'ARNm à partir de quelques cellules encapsulées en gouttes. En effet, actuellement très peu de plateformes intégrées permettent plusieurs modes d'analyse de cellules uniques, et il est particulièrement intéressant de séparer les acides nucléiques pour des analyses ultérieures telles que l'amplification et le séquençage. Pour la séparation, nous avons utilisé la technologie des pinces magnétiques développée dans notre laboratoire, qui permet de transférer efficacement des billes magnétiques d'une goutte à l'autre pour effectuer des protocoles bioanalytiques avec un très bon taux de purification et de façon

automatisable. Nous avons basé nos expériences sur des protocoles de bioanalyse récents non-microfluidiques qui permettent d'extraire l'ARNm et l'ADN sur des billes magnétiques à partir de cellules uniques. Afin de caractériser les performances d'extraction de notre système, nous avons réalisé deux types d'essais (RT-)qPCR qui nous permettent de quantifier exclusivement l'ADNg ou l'ARNm présents dans les solutions obtenues après la séparation. Pour optimiser et valider la faisabilité de notre approche, nous avons procédé en augmentant graduellement la complexité de l'échantillon. Cette progression étape par étape nous a permis de nous confronter et répondre progressivement aux nouvelles problématiques posées par la complexification de l'échantillon, notamment concernant la fusion passive des gouttes dans le capillaire. Les résultats obtenus sont prometteurs car ils démontrent pour la première fois dans un tel dispositif la séparation séquentielle de l'ADN et de l'ARNm à partir de lysat cellulaire ou de moins d'une dizaine de cellules entières encapsulées et lysées en gouttes. Pour démontrer l'intégrité des informations génomiques et transcriptomiques séparées par cette méthode, nous envisageons de faire du séquençage sur le matériel génomique et transcriptomique extrait en gouttes. Le défi le plus important à l'état actuel pour que notre système soit véritablement exploitable pour les applications biologiques présentes est d'augmenter le débit du processus microfluidique, en parallélisant ou miniaturisant le système par exemple.

Dans le chapitre 3, j'ai décrit le développement et l'optimisation d'un système microfluidique automatisable qui permet de traiter des échantillons protéiques en couplant notamment la microfluidique de gouttes à la spectrométrie de masse par MALDI-TOF : de la digestion enzymatique supportée en gouttes au dépôt sur plaque avec pré-concentration de l'échantillon cristallisé. Une première preuve de concept a été réalisée avec le lysozyme comme protéine modèle et notre protocole permet d'identifier la protéine par empreinte de masses peptidiques à partir de 200 fmol de protéine par goutte et ce avec une bonne fiabilité. Néanmoins à ce stade, il nous semble que la reproductibilité de la méthode pourrait être améliorée notamment en contrôlant l'environnement lors de l'évaporation des gouttes. De plus, un meilleur contrôle de la position de la concentration des cristaux d'échantillon/matrice pourrait rendre possible un passage en mode automatique de la plaque au spectromètre pour réaliser des mesures avec fragmentations ce qui permettrait d'identifier plusieurs protéines dans un mélange.

Annexe 1 : Détails expérimentaux de l'essai de RT-qPCR multiplexé

1. Sonde et amorces

GAPDH Chromosome 12 Exon 2- Exon 3

Exon-exon probe	3'- /5YakYel/AA GGT CGG A/ZEN/G TCA ACG GAT TTG GT/3IABkFQ/ -5'
Exon-exon forward	3'- CAC ATC GCT CAG ACA CCA T -5'
Exon-exon reverse	3'- GAT GGC AAC AAT ATC CAC TTT ACC -5'
Intron probe	3'- /56-FAM/TG GGC TTG C/ZEN/C CTG TCC AGT TAA TT/3IABkFQ/ -5'
Intron forward	3'- TGT AGG AGG GAC TTA GAG AAG G -5'
Intron reverse	3'- ACT CAA AGG GCA GGA GTA AAG -5'

2. Composition du mélange réactionnel et cycles PCR

Essai TaqMan (pour 25µL dans des tubes ou plaques pour PCR)

SuperScript® III RT/Platinum® Taq Mix	0.5 µL
2X Reaction Mix	12.5 µL
Forward primer, 10 µM	0.5 µL
Reverse primer, 10 µM	0.5 µL
TaqMan probe, 10 µM	0.25 µL
ROX Reference Dye	0.05 µL
Sample	1 µL
DEPC-treated water	To 25 µL

Programme RT-qPCR : 50°C 15 min, 95°C 2 min, 40x(95°C 15s, 60°C 30s)

Essai SYBR Green (pour 20µL dans des tubes ou plaques pour PCR)

KiCqStart® SYBR® Green qPCR ReadyMix	10 µL
Forward primer, 22.5 µM	0.25 µL
Reverse primer, 22.5 µM	0.25 µL
Sample	1 µL
DEPC-treated water	To 20 µL

Programme qPCR : 95°C 2 min, 40x(95°C 15s, 60°C 30s)

3. Valeurs des Ct pour les courbes de calibration des essais multiplexés

Exon-exon probe

Singleplex			
C (ng/µL)	**Ct N1**	**Ct N2**	**Ct N3**
174	16.773	16.831	17.083
17.4	20.148	20.257	20.267
0.74	24.818	24.458	24.711
0.174	27.866	28.355	26.562

Multiplex			
C (ng/µL)	**Ct N1**	**Ct N2**	**Ct N3**
174	16.931	16.932	16.987
17.4	20.624	20.731	20.559
0.74	25.346	25.124	24.806
0.174	27.886	27.918	28.088

Intron probe

Singleplex			
C (ng/µL)	**Ct N1**	**Ct N2**	**Ct N3**
174	20.767	20.730	20.778
17.4	24.163	24.167	24.227
0.74	28.477	28.684	28.657
0.174	31.338	31.089	31.218

Multiplex			
C (ng/µL)	**Ct N1**	**Ct N2**	**Ct N3**
174	20.473	20.489	20.475
17.4	24.157	24.076	24.054
0.74	28.376	28.161	28.198
0.174	30.969	31.319	31.416

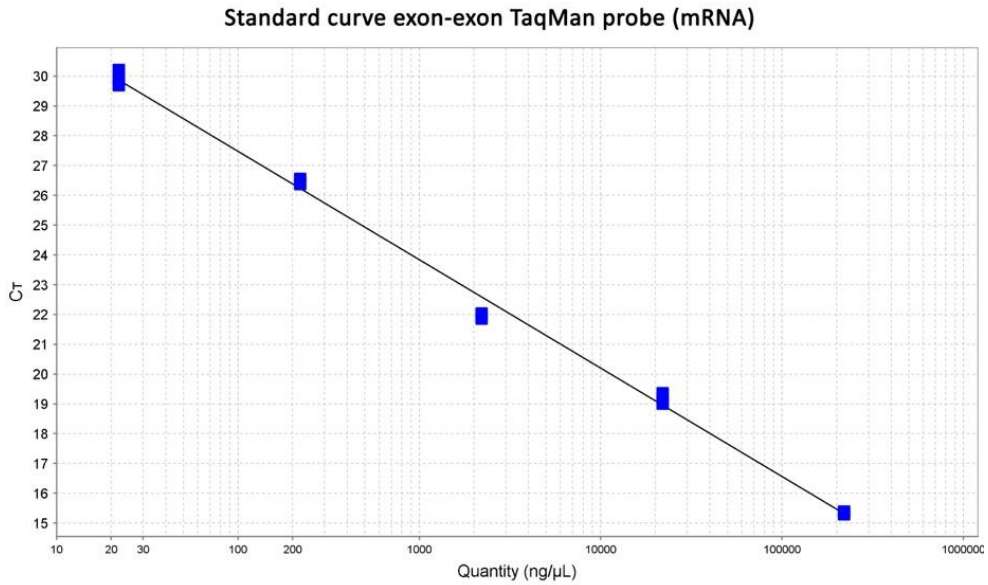
Annexe 2 : Essais de qPCR et RT-qPCR utilisés pour la quantification

Les concentrations des réactifs et les cycles de PCR sont les mêmes que ceux donnés en Annexe 1.

Exon 5 – Exon 6 ActinB Chromosome 7 TaqMan sonde pour l'ARNm

Exon-Exon probe	5'-/56-FAM/AAG ATC AAG /ZEN/ATC ATT GCT CC/3IABkFQ/ -3'
Primer forward	5'- GGA TGC AGA AGG AGA TCA CTG -3'
Primer reverse	5'- CGA TCC ACA CGG AGT ACT TG -3'

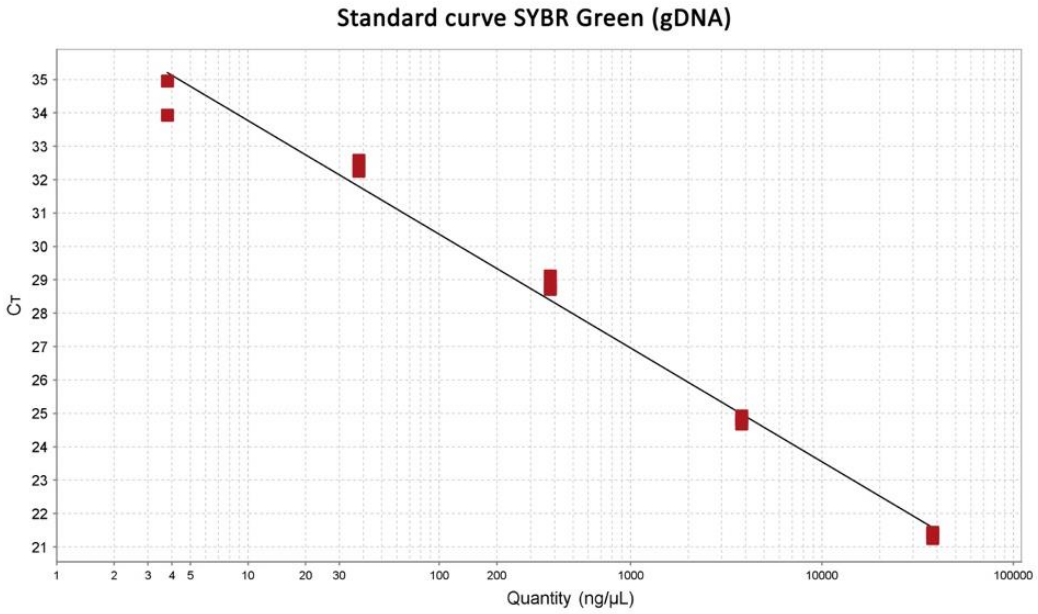
Amplicon de 90 pb



R^2=0.997 Efficacité = 88.3 %

Sonde SYBR Green pour l'ADN

Les primers utilisés sont les mêmes que pour l'ARN. La séquence intronique 5-6 n'étant que de 112 pb, l'amplicon a une longueur totale de 202 pb, ce qui reste assez court pour être bien amplifié lors des cycles de PCR.



R^2=0.987 Efficacité = 96.6 %

Annexe 3 : Fonctionnalisation des billes magnétiques avec la trypsine

1. Avec les billes Dynabeads M-270

Protocole tiré de :

"On-a-chip tryptic digestion of transthyretin: A step toward an integrated microfluidic system for the follow-up of familial transthyretin amyloidosis", Bataille et al, *Analyst*, 2018.

10 µL de la solution de billes magnétiques (Dynabeads M-270 Carboxylic acid, diamètre 2.8µm, 30 $mg.mL^{-1}$) sont lavés 3 fois avec une solution de PBS 1X.

450 µL d'une solution de trypsine (10 $mg.mL^{-1}$ dans du PBS 1X), 200 µL de solution d'EDC (10 $mg.mL^{-1}$ dans du PBS 1X) et 200 µL de solution de S-NHS (10 $mg.mL^{-1}$ dans du PBS 1X) sont ajoutés à la suspension de particules.

L'immobilisation de la trypsine est effectuée sur roue rotative pendant 3h à température ambiante.

La réaction est arrêtée et les enzymes non liées et les activateurs restants sont éliminés en lavant les billes magnétiques 3 fois avec du PBS 1X.

Ces particules sont gardées à 4°C dans la solution de PBS.

2. Avec les billes Ademtech

Protocole tiré de la thèse de Nicolas Minc : Microfluidique et billes magnétiques auto-organisées pour les analyses biologiques, 2005.

10 µL de la solution de billes magnétiques (Ademtech carboxyl coated beads, diamètre 600 nm) sont rincées 5 fois avec du PBS.

300 µL de la solution d'EDC (10 mg dans 300 µL de PBS) et 100 µL de la solution de S-NHS (2.5 mg dans 100 µL de PBS) sont ajoutés. 300 µL de la solution de trypsine (3 mg dans 300 µL de PBS) sont ajoutés.

La solution est laissée sur roue tournante 6h à température ambiante. Les billes sont ensuite rincées 5 fois avec du PBS.

Ces particules sont gardées à 4°C dans la solution de PBS.

RÉSUMÉ

La microfluidique de gouttes est une technologie qui possède un très grand potentiel pour la miniaturisation et l'automatisation des méthodes bioanalytiques conventionnelles. En effet, les nombreuses fonctionnalités présentes en microfluidique de gouttes, telles que la fusion, le tri et l'encapsulation de cellules, permettent de reproduire des protocoles bioanalytiques standards sur de très petits volumes avec des avantages tels que la diminution de la consommation d'échantillon et de réactifs et la diminution du temps d'analyse. Au cours de cette thèse, nous avons développé les protocoles pour deux types d'analyse biologique utilisant la manipulation de particules magnétiques en gouttes de 100 nL.

Le premier projet a porté sur l'analyse multiomique de cellules uniques. Nous avons conçu un protocole en microfluidique de gouttes permettant la séparation de l'ARNm et l'ADN d'un échantillon complexe : du mélange d'ADN et d'ARN pré-purifiés à une suspension de moins d'une dizaine de cellules entières. A chaque étape, les performances du système en gouttes ont été évaluées et les résultats comparés avec les extractions effectuées en tubes de manière non-microfluidique. Les résultats obtenus sont prometteurs car ils démontrent pour la première fois dans un tel dispositif la séparation séquentielle de l'ADN et de l'ARNm à partir de lysat cellulaire ou de quelques cellules entières encapsulées et lysées en gouttes.

Le second projet concerne la préparation d'échantillon en gouttes pour l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ce projet a été mené en collaboration avec des chercheurs du CEA Saclay qui ont montré qu'il y a un intérêt important à déposer les échantillons sur des plaques MALDI sous forme de gouttes pour augmenter la sensibilité de détection grâce à un effet de concentration. Nous avons mis en place un système automatisable qui permet de coupler la microfluidique de gouttes à la spectrométrie de masse MALDI-TOF : de la digestion enzymatique supportée en goutte au dépôt sur plaque avec pré-concentration de l'échantillon cristallisé. Le développement a été fait avec le lysozyme comme protéine modèle et notre protocole permet d'identifier la protéine par empreinte de masses peptidiques à partir de 200 fmol de protéine avec une bonne fiabilité.

MOTS CLÉS

Microfluidique de gouttes, pince magnétique, analyse multiomique, spectrométrie de masse MALDI TOF

ABSTRACT

Droplet microfluidics is a technology with a huge potential for miniaturization and automation of conventional methods in bioanalysis. Indeed, droplet microfluidics has many functionalities, such as merging, sorting and cell encapsulation, that can reproduce manipulations in standard protocols in bioanalysis on very small volumes with advantages such as a low samples and reagents consumption and reduction of analysis duration. During this thesis, we developed protocols for two types of biological analysis, using magnetic particles manipulation in 100 nL droplets.

The first project is about single cell multiomics analysis. We implemented a droplet microfluidics protocol for the separation of mRNA and DNA from complex samples: from a mix of pre-purified RNA and DNA to a suspension of less than ten cells. At each steps, the droplet system performances were evaluated and the results were compared to extractions made in tubes in a non-microfluidics way. The results are very promising since they demonstrate for the first time in such a system the sequential separation of DNA and RNA from cell lysate or a few cells encapsulated and lysed in droplets.

The second project is about the sample preparation in droplet for MALDI-TOF mass spectrometry analysis. This project was built in collaboration researchers from CEA Saclay. They have shown that it is very interesting to deposit samples in droplets on MALDI plates to increase the detection sensitivity thanks to a focusing effect. We have implemented on an original integrated droplet microfluidic approach for protein analysis by MALDI-TOF MS: from in drop sample preparation by supported enzymatic digestion to on plate deposition and peptides local pre-concentration. Development was done with lysozyme as a model protein and thanks to our in-drop digestion and deposition protocol we identified this protein by mass fingerprint from 200 fmol protein with a good reliability.

KEYWORDS

Droplet microfluidics, magnetic tweezer, multiomics analysis, MALDI TOF masse spectrometry